



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Fauna culicidéológica e espécies do complexo *Anopheles gambiae* nas áreas urbana semiurbano e rural da região de Bissau,
Guiné-Bissau

Fabião Augusto Rodrigues Gomes Ocante

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA

OUTUBRO DE 2017



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Fauna culicideológica e espécies do complexo *Anopheles gambiae* nas áreas urbana semiurbano e rural da região de Bissau, Guiné-Bissau

Autor: Fabião Augusto Rodrigues Gomes Ocante

Orientador: Prof. Doutor João Pinto (UEIPM/IHMT/UNL).

Coorientadores: Dr. Plácido Cardoso (INSA/G-Bissau) e Prof. Doutora Carla Sousa (UEIPM/IHMT/UNL).

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessário á obtenção do grau de mestre em parasitologia médica

OUTUBRO DE 2017

A Deus, dono de toda a ciência sabedoria e poder.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos, para as pessoas que, de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste mestrado.

A minha família, em especial a minha amiga e esposa, e as minhas filhas, que estão comigo desde início desta jornada.

Aos meus orientadores Prof. Dr. João Pinto, Dr. Plácido Cardoso e a Prof. Dra. Carla Sousa, pelo apoio na realização deste trabalho e por tudo o que me ensinaram.

Ao Prof. Dr. Paulo Almeida, pelo dinamismo, dedicação e paciência nos ensinamentos na identificação dos mosquitos.

Ao Gonçalo Seixas, pelo apoio incondicional desde inicio desde trabalho, pela paciência que teve comigo no laboratório, e principalmente pela tua amizade e companheirismo.

A todo o grupo e professores da Entomologia médica do IHMT, meu obrigado pela disponibilidade, simpatia e apoio prestado durante a realização deste mestrado.

A todos os técnicos do Instituto Nacional de Saúde Publica da Guiné-Bissau (INASA) em especial ao João Dinis pelo apoio e colaboração durante a colheita entomológica no terreno.

E finalmente, a todos os alunos do curso de Mestrado em Parasitologia Médica (MPM_2015/2017).

RESUMO

As doenças transmitidas por vetores representam uma emergência para a saúde pública global, representando mais de 17% das doenças infecciosas, causando mais de 700 mil mortes por ano. Nos últimos anos, a incidência de casos de malária foi reduzida em 41,0% e a taxa de mortalidade diminuiu em 62,0%. Este avanço foi alcançado através dos maiores esforços dos governos na implementação de programas contra o vetor. Em contraste, o número de casos de infecção por vírus da Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela aumentou dramaticamente e em co-circulação em algumas regiões. O aumento das viagens e do comércio internacional, a urbanização não planejada, as novas práticas agrícolas e o aumento da mobilização da população das áreas rurais para as áreas urbanas acompanhadas de mudanças climáticas, são um dos fatores que contribuem para a disseminação dessas doenças.

Guiné-Bissau está no topo do ranking mundial de usuários de mosquiteiros e conseguiu reduzir a incidência de malária em 80% em adultos em 90% em crianças menores de cinco anos. Não há casos documentados de Dengue Chikungunya e ou Febre Amarela no país. Em 2016, quatro casos de Zika foram relatados no país. Ao contrário dos vetores da malária (*Anopheles gambiae* sl.), pouco se sabe sobre os vetores de Arboviroses (*Aedes aegypti*). O único reporte no país foi 2009, quando *Aedes aegypti* foi identificado nas ilhas Bijagós (Brown *et al.*, 2009).

Os objetivos deste estudo foram: I) - Comparar a fauna culicidéológica em três áreas distintas de Bissau, urbana semiurbano e rural (U, SU e R); II) - Caracterizar a distribuição do complexo *An. gambiae* e *Ae. aegypti* nestas três áreas.

As armadilhas de luz CDC foram usadas para coletar adultos e ovitraps e prospeção de larvas direcionadas foram realizadas. As amostras coletadas de mosquito foram identificadas morfológicamente ou por ensaios moleculares.

A riqueza de espécies foi maior na área rural, embora a biodiversidade (medida pelo índice de Shannon) fosse comparável entre as áreas. Na área rural e semiurbana, *An. gambiae* era a espécie mais abundante enquanto *Anopheles Arabiensis* predominou na área urbana. *Aedes aegypti* foi mais abundante na área urbana, embora apresentasse taxas de infestação acima do limite do risco de epidemia de arbovírus nas três áreas estudadas.

A crescente urbanização que ocorreu recentemente na região de Bissau não parece ter provocado grande alteração na distribuição dos principais vetores (*An. gambiae* e *Ae. aegypti*), em comparação com o que seria esperado, dado suas características bioecológicas. No entanto, mudanças ambientais podem constituir a base da introdução de *An. arabiensis* nesta região costeira e o aumento da abundância de *Anopheles coluzzii* na área urbana.

Palavras-Chave: Guiné-Bissau; Diversidade culicideológica; Complexo *Anopheles gambiae*; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Vector-borne diseases represent an emergency for global public health, accounting for over 17% of infectious diseases, causing more than 700,000 deaths per year. In recent years, the incidence of malaria cases has been reduced by 41.0% and the mortality rate has decreased by 62.0%. This advance was achieved through increased efforts by governments in the implementation of anti-vector programs. In contrast, the numbers of cases of Dengue, Zika, Chikungunya and Yellow Fever virus infection have increased dramatically, and in co-circulation in some regions. Increased travel and international trade, unplanned urbanization, new agricultural practices, and increased mobilization of the population from rural to urban areas accompanied by climate change are one of the factors contributing to the spread of these diseases.

Guinea-Bissau is at the top of the world ranking of users of mosquito nets and managed to reduce the incidence of malaria by 80% in adults by 90% in children under five. There are no documented cases of Dengue Chikungunya and or Yellow Fever in the country. In 2016, four cases of Zika were reported in the country. Unlike the vectors of malaria (*Anopheles gambiae* sl.), little is known about the vectors of Arboviruses (*Aedes aegypti*). The only report in the country was in 2009, when *Aedes aegypti* was identified in the Bijagós islands (Brown *et al.*, 2009).

The objectives of this study were: I) - To compare the culicideological fauna in three distinct areas of Bissau, urban, semi-urban and rural environment (U SU and R); II) - Characterize the distribution of the *An. gambiae* complex, and *Ae. aegypti* in these three areas.

CDC light traps were used to collect adults and ovitraps and larval prospection directed were performed. Collected mosquito samples were identified morphologically or by molecular assays.

Species richness was highest in the rural area, although biodiversity (as measured by the Shannon index) was comparable between areas. In rural and semi-urban areas, *An. gambiae* was the most abundant species while *Anopheles arabiensis* predominated in the urban area. *Aedes aegypti* was more abundant in the urban area, although it presented infestation rates above the limit of arbovirus epidemic risk in the three areas studied.

The increasing urbanization that has recently occurred in the Bissau region does not seem to have caused a major change in the distribution of the main vectors (*An. gambiae* and *Ae. Aegypti*), compared to what would be expected given their bioecological characteristics. However, environmental changes may form the basis of the introduction of *An. Arabiensis* in this coastal region and the increase of *Anopheles coluzzii* abundance in the urban area.

Keywords: Guinea-Bissau; Culicideological diversity; *Anopheles gambiae* complex; *Aedes aegypti*.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|----|
| AGRADECIMENTOS----- | iv |
| RESUMO----- | v |
| ABSTRACT----- | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS----- | ix |
| 1. INTRODUÇÃO----- | 1 |
| 1.1. Importância das doenças transmitidas por vetores----- | 1 |
| 1.2. Malária----- | 2 |
| 1.3. Arboviroses----- | 3 |
| 1.4. Situação das doenças transmitidas por mosquitos vetores na Guiné-Bissau----- | 9 |
| 1.5. O complexo <i>Anopheles gambiae s.l.</i> ----- | 11 |
| 1.6. <i>Aedes aegypti</i> ----- | 13 |
| 2. OBJETIVOS----- | 15 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS----- | 16 |
| 3.1. República da Guiné-Bissau----- | 16 |
| 3.2. Área de estudo----- | 16 |
| 3.3. Colheitas entomológicas----- | 19 |
| 3.4. Identificação morfológica----- | 22 |
| 3.5. Extração de ADN de mosquitos do complexo <i>An. gambiae</i> ----- | 23 |
| 3.6. Identificação de espécies do complexo <i>An. gambiae</i> ----- | 24 |
| 3.7. Identificação de <i>An. gambiae</i> e <i>An. coluzzii</i> | |

| | |
|---|----|
| por SINE-PCR----- | 25 |
| 3.8. Detecção de fragmentos em gel de agarose----- | 25 |
| 3.9. Análise estatística e tratamento dos resultados----- | 25 |
| 4. RESULTADOS----- | 27 |
| 4.1. Adultos----- | 27 |
| 4.2. Larvas----- | 30 |
| 4.3. Ovos----- | 32 |
| 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES----- | 34 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----- | 37 |
| ÍNDICE DE FIGURAS----- | 49 |
| ÍNDICE DE TABELAS----- | 50 |
| ANEXOS----- | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Bovine serum albumin (Albumina de soro bovino)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

ddH₂O – Água bidestilada

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – 3'-deoxyribonucleotide triphosphate-5' (3'- desoxirribonucleotídeo -5'-trifosfato)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

IGS – Intergenic spacer (Espaçador intergénico)

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS – Internal transcribed spacer (Espaçador interno transcrito)

mtDNA – mitochondrial DNA (DNA mitocondrial)

N – Tamanho da amostra

Pb – Pares de bases

PCR – Polymerase chain reaction (Reacção de polimerização em cadeia)

PCR-RFLP – Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism (Reacção de polimerização em cadeia – Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição)

rDNA – ribosomal DNA (DNA ribossomal)

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

SINE – Short interspersed element (Elemento curto intercalado)

TBE – Tris/Borato/EDTA (solução tampão constituída por base Tris, ácido bórico e

EDTA)

TEP – Thioester-containing protein

U – Unidades de enzima

UEIPM – Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – Ultravioleta

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das doenças transmitidas por vetores

As doenças transmitidas por vetores representam hoje uma emergência para a saúde pública global e são motivo de crescente preocupação para Organização Mundial de Saúde. Estas doenças têm causado uma elevada taxa morbidade e mortalidade, principalmente em países de baixa renda, provocando o aumento da pobreza, abandono escolar, diminuição da produtividade econômica e sobrecarga nos sistemas de saúde.

Segundo WHO (2017), existem todos os anos mais de 1000 milhões de casos e mais de 1 milhão de mortes mundialmente provocadas por doenças transmitidas por vetores como Malária, Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela, Filariose Linfática, Tripanossomose Humana Africana, Leishmaniose e a doença de Chagas, representando mais de 17% de todas as doenças infecciosas com mais de 700 000 mortes por ano. Além das áreas tropicais e subtropicais onde habitualmente estas doenças são endêmicas, nos últimos anos tem-se assistido uma expansão para outras áreas geográficas. Esta propagação está a ser determinada por uma complexa dinâmica de fatores ambientais e sociais, nomeadamente, o aumento das viagens e do comércio internacional, a urbanização não planeada, a introdução de novas práticas agrícolas, o aumento da mobilização da população da região rural para urbana e as alterações climáticas, particularmente as ligadas ao aquecimento global. (Gubler, 1998a, 2011b; WHO, 2017).

Sem ignorar a importância médica dos outros artrópodes vetores, os mosquitos são considerados os vetores mais perigosos no mundo. Existem um pouco mais de 3.500 espécies de mosquitos agrupadas em aproximadamente 41 géneros em todo o mundo, sendo que algumas espécies se destacam pela capacidade de transmitir mais do que uma doença aos seres humanos. Por exemplo, *Anopheles s.p.* incluem os principais vetores da malária, *Aedes s.p.* responsáveis pela transmissão das principais arboviroses (Chikungunya, Dengue, Zika, Febre Amarela, e Febre Vale do Rift) e *Culex sp.*, responsáveis pela transmissão da Filaríase Linfática, Encefalite Japonesa e Febre do Nilo Ocidental (Almeida *et al.*, 2011). Os dois primeiros (*Anopheles* e *Aedes*), destacam-se pela importância médica e pelo impacto das doenças que transmitem sobre a saúde.

Estima-se que em 2012, a malária causou mais de 627 mil mortes e em 2016 são mais de 400 mil mortes por ano em todo o mundo, a maioria das vítimas são crianças menores de cinco anos (World Malaria Report 2016). Entretanto nos últimos 50 anos, a incidência de casos de Dengue aumentou 30 vezes, e mais de 2,5 mil milhões de pessoas em mais de 100 países estão em risco de contrair esta doença (Braga *et al.*, 2007).

1.2. Malária

A Malária é transmitida pela picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*, sendo causada por cinco espécies de parasitas do género *Plasmodium*, nomeadamente *Plasmodium falciparum* (Welch 1896), *Plasmodium vivax* (Grassi and Feletti 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran 1880) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton and Mulligan 1932) (Despommier *et al.*, 2000; Antinori *et al.* 2012). A infeção por *P. falciparum* é a que causa maior mortalidade sendo mais frequente no continente Africano. O *P. vivax* apesar da sua maior dispersão a nível mundial, apresenta menor virulência. As restantes espécies são menos frequentes (Okwa, 2012).

Segundo o relatório da WHO (2016), o aumento dos esforços no combate da Malária reduziu significativamente o número de casos desta doença em muitas regiões. De acordo com o mesmo relatório, desde 2000 os países têm alcançado um progresso substancial na luta contra a Malária. Entre 2000 e 2015, a incidência de casos por Malária foi reduzida em 41,0% e a taxa de mortalidade reduziu 62,0%. Esse sucesso deve ser atribuído ao esforço dos países na aplicação em larga escala dos programas de intervenções para o controlo desta doença. No entanto, no início de 2016 a Malária ainda era endémica em 91 países e territórios mais de 3,2 mil milhões de pessoas estavam em risco de contrair esta doença (WHO, 2016, 2017; Figura 2).

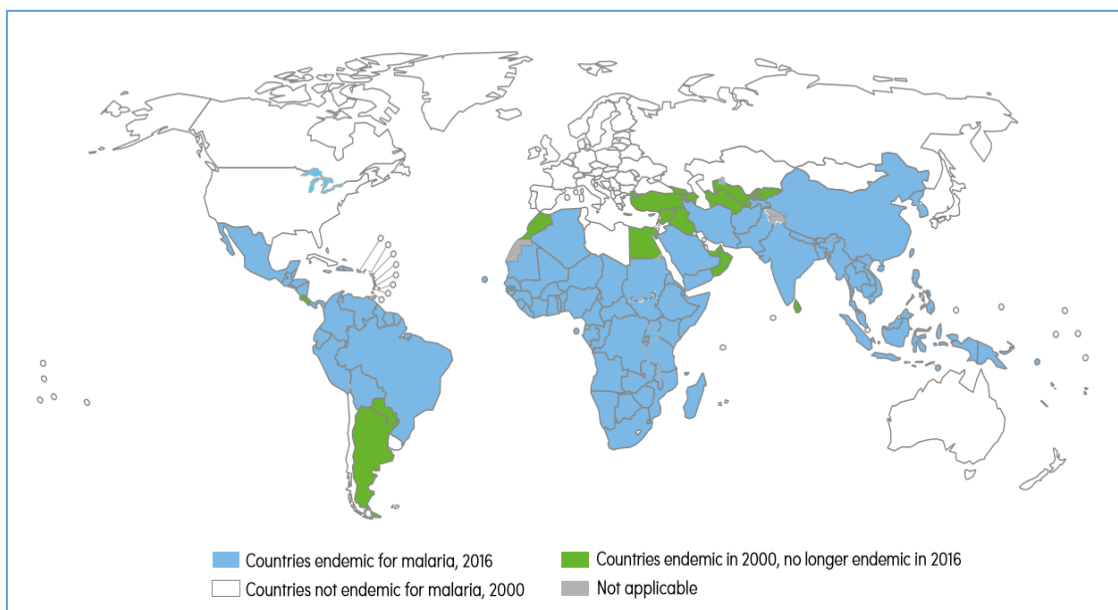


Figura 1. Países endêmicos da Malária em 2000 e em 2016. Fonte: World Malaria Report, 2016.

A Malária continua a provocar um elevado número de óbitos em crianças menores de cinco anos de idade, principalmente em África onde a cada dois minutos uma criança morre por Malária (WHO, 2016). A região Africana Subsariana apresenta um número desproporcionalmente elevado de casos da Malária a nível global. Em 2015, esta região apresentava 90,0% dos casos da Malária e 92,0% dos óbitos por ano, seguido da Região Sudeste Asiática com 7,0% dos casos e 6,0% das mortes, e Região Oriental do Mediterrâneo 2,0% e 2,0% das mortes.

Estima-se que, em 2015, aproximadamente 355 milhões de pessoas em África Ocidental estavam ainda em risco continua de contrair esta doença (WHO/World Malária Report, 2016)

1.3. Arboviroses

Arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos por artrópodes aos seres humanos e outros animais vertebrados pela picada de artrópodes hematófagos. Os arbovírus que causam doenças em humanos pertencem a cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. Estima-se que existem mais de 545 espécies de arbovírus, de entre as quais, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, maioritariamente zoonóticas (Lopes *et al.*, 2014). As arboviroses

transmitidas por *Aedes sp.* (Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela) são hoje uns dos principais problemas da Saúde pública, e em algumas regiões vírus circulam em simultâneo (Alfonso *et al.*, 2016).

1.3.1. Dengue

Dengue (ou Febre da Dengue) é uma doença febril aguda, causada por infecção com qualquer um dos 4 vírus de RNA de cadeia simples do gênero *Flavivirus*, o vírus da Dengue (DENV) 1, 2, 3 ou 4. (WHO, 2016). Os DENV são transmitidos aos humanos pela picada de mosquitos fêmea infectados do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. Aegypti* e *Aedes albopictus*.

Acredita-se que as primeiras epidemias da Dengue ocorreram no final do século XVIII, em Jacarta Indonésia, e no Cairo, Egito (1779), e na Filadélfia e Pensilvânia, em 1780 (Nunes, 2011). Nos últimos 50 anos a Dengue tem causado grandes problemas de saúde pública a nível mundial (Figura: 2). A incidência de casos de Dengue em todo mundo aumentou 30 vezes (Hasan, *et al.*, 2016; WHO, 2016).

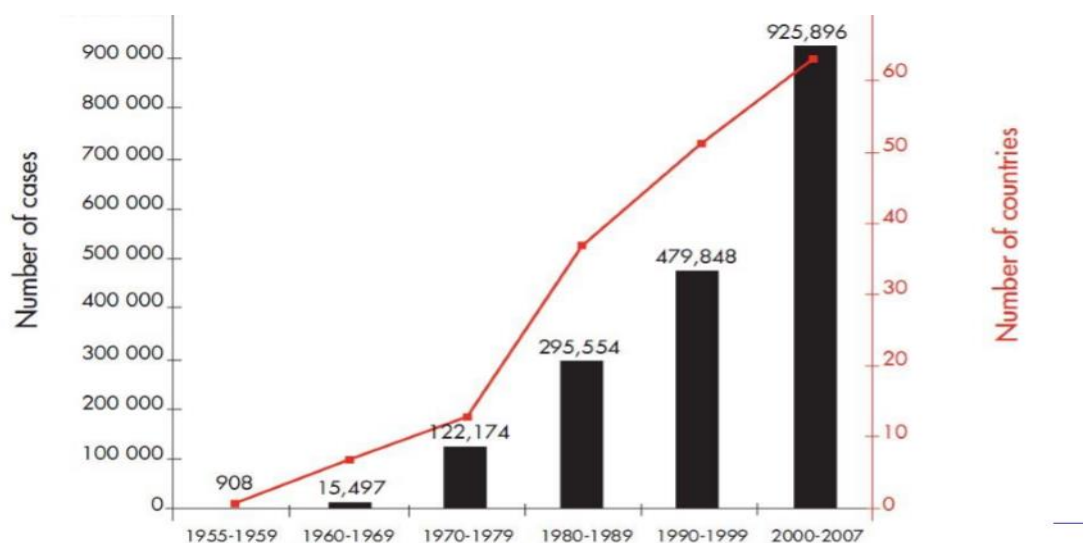


Figura 2. Evolução e dispersão global do DENV entre 1955 a 2007. Fonte: WHO (2009).

Nos países tropicais, o Dengue é a segunda infecção transmitida por vetores mais importante depois da malária e, atualmente, cerca de 40% da população mundial vive em áreas com o risco de transmissão da Dengue. A doença é endêmica em mais 100 países da Ásia, Pacífico, Américas, África e Caraíbas (WHO, 2016). Embora a distribuição

geográfica da Dengue seja semelhante à da Malária, o risco da infecção por DENV é maior nas áreas urbanas e residenciais do que a malária.

As últimas atualizações da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que ocorrem cerca de 50 a 400 milhões de infecções por ano, que causam e mais de 500.000 hospitalizações associadas a quadros clínicos graves de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). O número de óbitos estimados por ano são 25,000, principalmente entre as crianças (Murray *et al.*, 2013).

É difícil estimar o impacto real da Dengue a nível mundial devido os fatores como: diagnóstico incorreto da doença, uma vigilância inadequada e baixos níveis de notificação da doença (Murray *et al.*, 2013). Por exemplo em África, pouco se sabe sobre incidência da Dengue, entre 1960-2010, apenas 22 países relataram epidemias ou casos esporádicos da Dengue, e 12 países relataram apenas casos em viajantes. A presença de doença e alta prevalência de anticorpos contra o vírus da Dengue em pesquisas sorológicas sugerem a endemidade do vírus em algumas áreas do continente (Amarasinghe *et al.*, 2011).

Só nos últimos três meses, foram notificados cerca de 1107 casos da infecção por vírus da Dengue em todo mundo (healthmap), Figura 3.

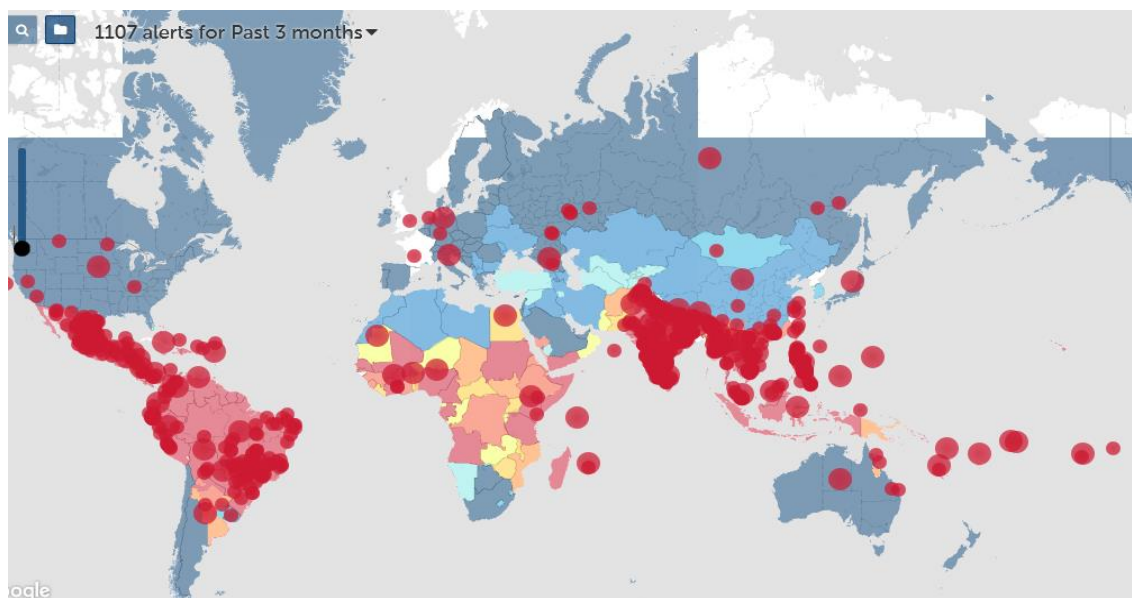


Figura 3. Alertas da dengue nos últimos três meses, outubro de 2017. Fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/en/>

1.3.2. Zika

O vírus da Zika (ZIKV) é um vírus de RNA de cadeia simples da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (Kuno *et al.*, 1998; Junior *et al.*, 2015).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 no Uganda, a partir de uma amostra de um macaco *Rhesus* sentinela para vigilância da Febre Amarela (Dick *et al.*, 1952). Os primeiros casos de infecção por ZIKV em seres humanos foram no Uganda em 1952 (Dick *et al.*, 1953). Até 2006, apenas foram relatados casos esporádicos, mais concretamente em África entre 1975 a 19977 (Serra Leoa, Nigéria, Senegal, Gabão, Costa do Marfim) (Robin *et al.*, 1975), e na Ásia (Malásia, 1960) (CDC, 2016).

Em 2007 foram documentadas epidemias da Zika na Federação dos Estados da Micronésia (na ilha de Yap) (Lanciotti *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009). A doença disseminou-se rapidamente pelas ilhas do Pacífico mais concretamente para Polinésia Francesa, com uma epidemia com mais de 19,000 casos suspeitas da infecção pelo ZIKV (Cao-Lormeau *et al.*, 2013). O ZIKV ganhou maior protagonismo em 2015, quando foi identificado pela primeira vez no hemisfério ocidental, e com um grande surto do Brasil. Entre janeiro a agosto de 2016, foram registrados 196.976 casos suspeitos da infecção pelo ZIKV no Brasil, 96.494 em mulheres em idade fértil (Ministério da Saúde do Brasil, 2016).

O vírus se espalhou pelas Américas, e nos ultimo mês, healthmap referenciou aproximadamente 39 alertas de casos da Zika nas Américas, Ásia e Europa (Figura 4).

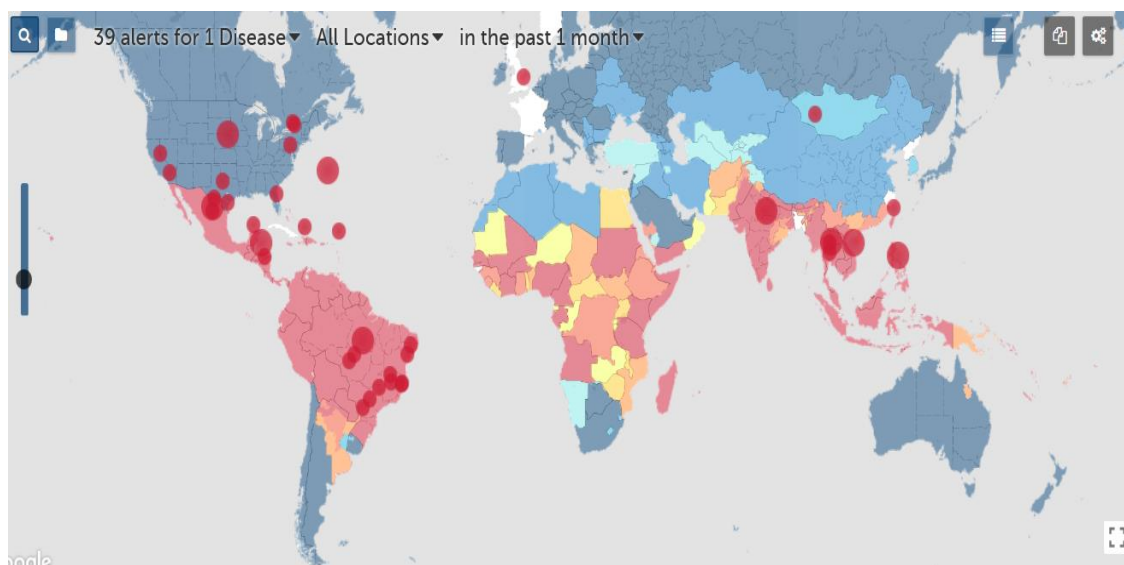


Figura 4. Alerta da Zika no ultimo mês, (outubro de 2017). Adaptado para Zika: <http://www.healthmap.org/dengue/en/>

1.3.3. Chikungunya

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA de cadeia simples que pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. (Donalisio *et al.*, 2015). O vírus da Chikungunya geralmente causa elevadas taxas de infecção, afetando entre um terço (1/3) a três quartos (3/4) da população em áreas onde este vírus circula. Surtos de chikungunya ocorreram na África, Ásia, Europa e ilhas dos oceanos Índico e Pacífico. No final de 2013, os primeiros casos autóctones de Chikungunya foram relatados nas ilhas das Caraíbas. No final de 2014, mais de 1,1 milhões de casos suspeitos de chikungunya foram relatados nas Américas. Até finais de abril de 2016, aproximadamente 103 países relataram casos de infecção por vírus de Chikungunya. (Figura 5).

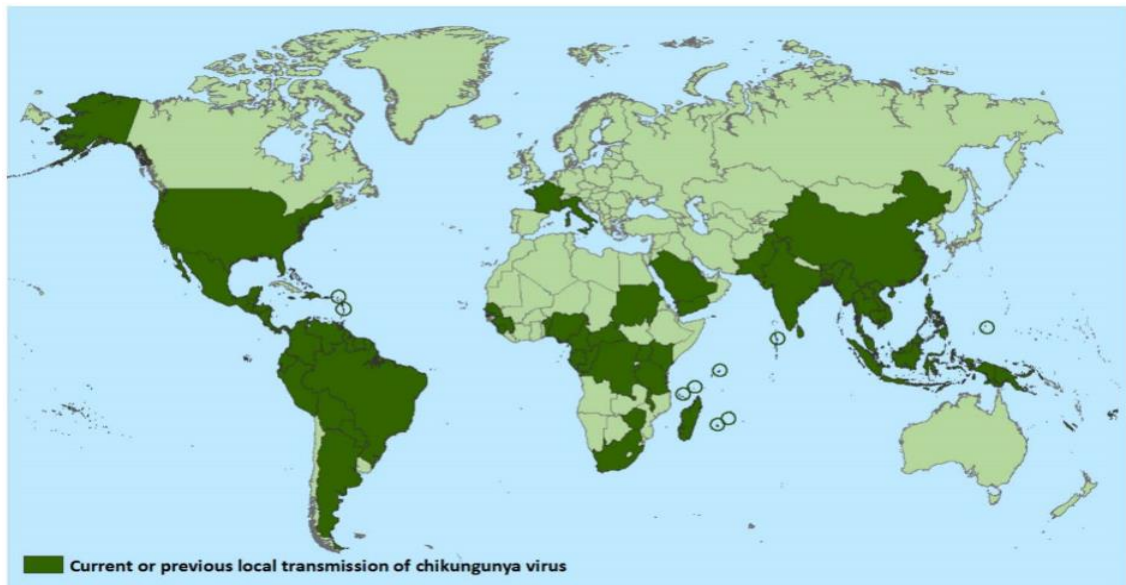


Figura 5. Países e territórios onde foram relatados casos de Chikungunya (até finais de abril de 2016). Fonte: CDC, 2017

1.3.4. Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela (FAV) é um vírus de RNA de cadeia simples que pertence ao gênero *Flavivirus*. O vírus está presente na África subsaariana e na América do Sul, com surtos epidêmicos intermitentes (Gershman *et al*, 2012).

Esta doença é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas, e pode causar epidemias devastadoras de doença hemorrágica potencialmente fatal. As campanhas de vacinação em massa contribuíram muito para prevenir e controlar as epidemias. Em 1940, foi iniciada a imunização em massa em alguns países da África, onde 25 milhões de pessoas foram imunizadas a cada quatro anos, e como consequência, a doença desapareceu gradualmente nestes países, enquanto países sem programas de imunização continuam endêmicas. No entanto, o risco de grandes epidemias de Febre Amarela vem crescendo especialmente em áreas urbana e semiurbana com grande densidade populacional, tanto na África como nas Américas, aumentou consideravelmente devido: 1) decrescente cobertura de imunização; 2) rápida urbanização e 3) a reintrodução de mosquito vetor nas áreas urbana e semiurbana desses continentes (Vainio *et al.*, 1998). A Organização Mundial de Saúde estima que ocorrem anualmente em todo o mundo mais de 200.000 casos da infecção por FAV, e mais de 30.000 óbitos. No ultimo mês foram notificados 34 casos da infecção por FAV em todo o mundo. (healthmap), figura: 6.

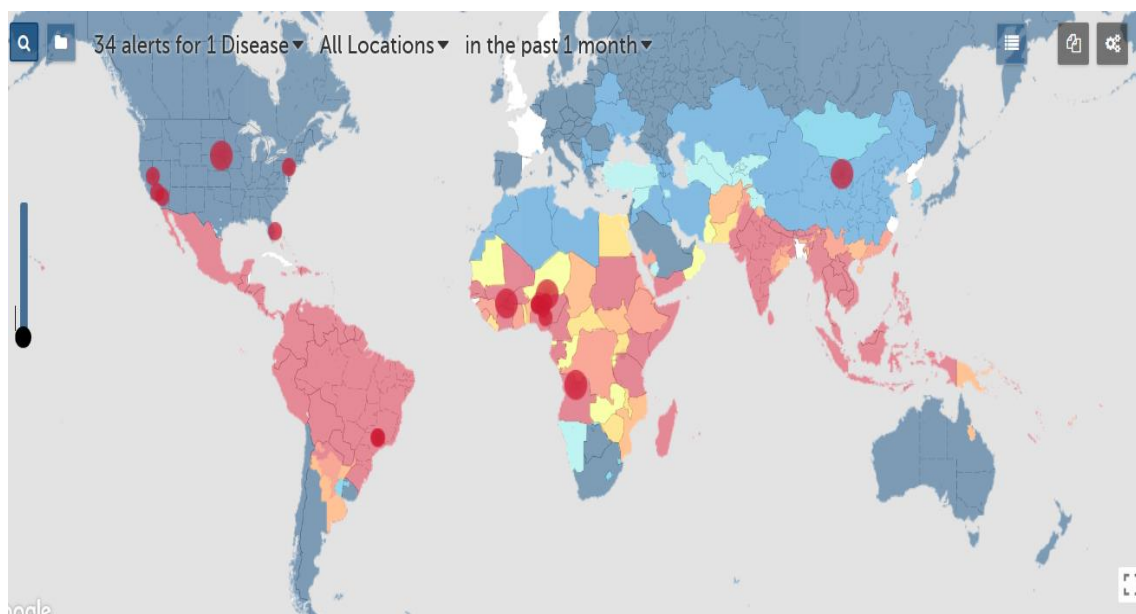


Figura 6. Alertas das infecções por vírus da Febre Amarela no ultimo mês (outubro 2017). Adaptado para Chikungunya: <http://www.healthmap.org/dengue/en/>

1.4. Situação das doenças transmitidas por mosquitos vetores na Guiné-Bissau

A Malária é a única doença transmitida por vetores que está na lista das principais causas da morte na Guiné-Bissau. Em 2013, a foi a principal causa de morte entre crianças menores de 5 anos, com 18% dos óbitos (Figura 7). No mesmo ano, foram registados mais de 175.000 casos de malária e 472 mortes. As crianças menores de cinco anos foram os mais afetados, representando cerca de 41% de todos os casos e 45% das mortes. O gasto médio estimado por pessoa no tratamento da Malária é aproximadamente de 2,5 US\$. (World Malaria Report, 2016).

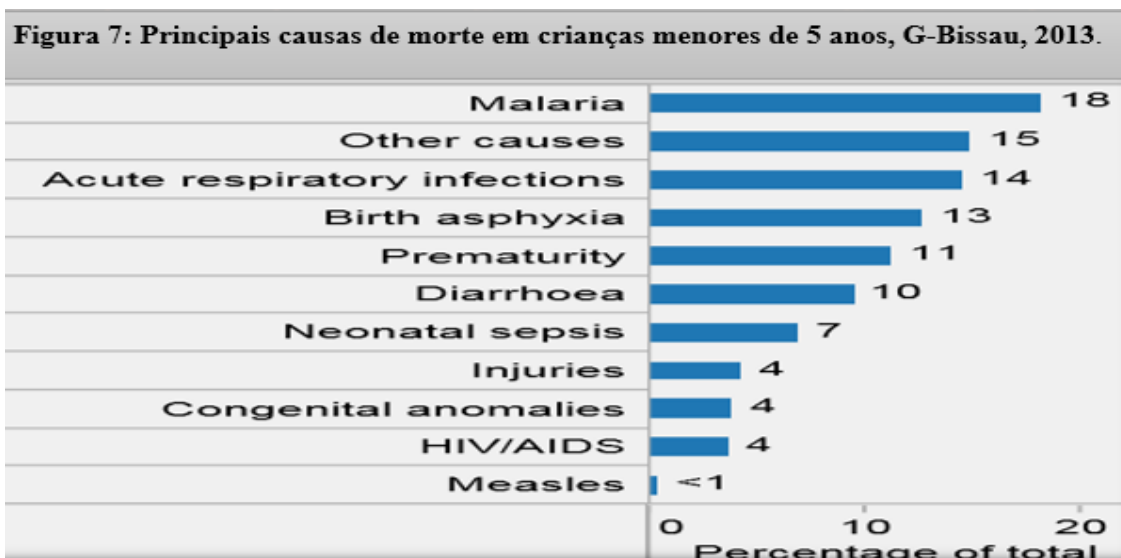


Figura 7. Principais causas de morte em crianças menores de 5 anos, Guiné-Bissau, 2013.
Fonte: WHO, 2015.

A Guiné-Bissau é considerado um país mesoendêmico a hiperendêmico para Malária (Arez *et al.*, 2003; Diabiré *et al.*, 2008). A doença está dispersa em todo o país, apresentando um pico de transmissão no final da época das chuvas (entre outubro e novembro). Os principais vetores desta doença na Guiné-Bissau, tal como em toda região da África Ocidental, são membros do complexo *An. gambiae* (Garrett-Jones, 1964).

Como medidas de prevenção e tratamento da Malária na Guiné-Bissau, existe uma ampla utilização de redes mosquiteiras impregnadas (aproximadamente 80% de cobertura) e a utilização dos derivados de Artemisina em combinação terapêutica (ACT), em particular Artemeter-Lumefantrina (Coartem®), como tratamento de primeira linha, de acordo com as recomendações da OMS (Rodrigues *et al.*, 2008). O quinino é utilizado no país como medicamento de segunda linha no tratamento da Malária. Tanto as redes mosquiteiras impregnadas como os ACT são distribuídos gratuitamente pelos serviços nacionais de saúde.

A par do resto da região da África Ocidental, a Guiné-Bissau alcançou um progresso notável na luta contra Malária. Entre 2000 a 2012, a Malária passou de primeira para terceira causa de morte no país. Entre 2012 e 2014, a incidência diminuiu mais de 80% entre os adultos e mais de 90% entre as crianças com menos de cinco anos. Em 2015, o país está no topo do ranking mundial dos utilizadores de redes mosquiteiras (WHO, 2016).

Quanto às arboviroses, não há registo de casos de Dengue, Chikungunya e Febre Amarela no país. Apesar de confirmada a presença de um dos principais vetores destas doenças (*Ae. aegypti*), pelos técnicos do INASA, até a data, não há relatos (verbais ou documentados) destas doenças no país. Em 2016, foram notificados 4 casos suspeitos de infecção por ZIKV nas ilhas de Bijagós e posteriormente foram todos confirmado em Instituto Pasteur em Dakar, Senegal. Desde então, não foram notificados casos desta doença no país. (INASA, 2016-não publicado).

1.5. O complexo *Anopheles gambiae* sl.

Varias espécies vetores da malária pertencem a um complexo de espécies gémeas morfologicamente indistintas, mas que diferem geneticamente (Service, 1993; della Torre *et al.*, 1997). O complexo *Anopheles gambiae* inclui os principais vetores de malária na África Subsaariana, é composto por oito espécies (Coetzee *et al.*, 2013).

- *Anopheles gambiae* ss. Gilles, 1902
- *Anopheles merus* Dönitz, 1902;
- *Anopheles melas* Theobald, 1903;
- *Anopheles arabiensis* Patton, 1905;
- *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911;
- *Anopheles bwambae* White, 1985;
- *Anopheles coluzzii* Coetzee *et al.*, 2013.
- *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013.

Anopheles gambiae ss. e *An. coluzzii* são espécies morfologicamente idênticas, amplamente distribuídos em África Ocidental e em simpatria em muitas regiões (della Torre *et al.*, 2001; della Torre *et al.*, 2005). Contudo, mostram diferenças moleculares e bioecológicas (Coluzzi *et al.*, 1985; Lehmann & Diabaté, 2008; Costantini *et al.* 2009;). *An. gambiae* ss. são encontrados preferencialmente nos habitats aquáticos temporários e principalmente durante estação das chuvas, enquanto que a *An. coluzzii* estão presentes durante todo o ano, preferencialmente em habitats aquáticos permanentes feitos pelo homem (arrozais) (Costantini *et al.*, 2009;).

Anopheles arabiensis, é também um importante vetor de malária, e está distribuído em extensas regiões da África subsariana e em simpatria com *An. gambiae* ss. e *An. coluzzii* em algumas regiões (Sinka *et al.*, 2012).

Anopheles melas e *An. merus* são vetores secundários da malária, estão associados a habitats larvares de águas salobras, estando restritos às zonas costeiras com mangais na África Ocidental e Oriental (Dabiré *et al.*, 2008).

Anopheles bwambae é um vetor local na zona ocidental no Uganda limitada ao Parque Florestal Nacional de Semliki (White, 1885; Gillies & Coetzee, 1987).

Anopheles quadriannulatus e *An. amharicus* não são vetores da malária, são espécies zoofílicas e estão dispersas o sudeste africano (Coluzzii, 1984; Coetzee *et al.*, 2000).

Esta distribuição espaço temporal, tem implicações na epidemiologia da transmissão da malária. As áreas irrigadas com maior atividade agrícola oferecem oportunidades de reprodução permanente dos vetores mais adaptados a estas áreas e, como consequência, a malária é potencialmente transmitida ao longo do ano (Gimonneau *et al.*, 2011).

1.5.1. Complexo *An. gambiae* na Guiné-Bissau

A Guiné-Bissau apresenta áreas ecológicas distintas que influenciam distribuição destas espécies vetores, desde o litoral ao interior do país. Em levantamentos entomológicos anteriores, foi identificada a presença de quatro espécies do complexo: *An. coluzzii*, *An. gambiae* ss., *An. melas* e *An. arabiensis* (Petrarca *et al.*, 1983; Jaenson *et al.*, 1994; Gordicho *et al.* 2014).

No litoral, área caracterizada por terrenos de pouco relevo, afetadas pelas alterações das marés, terrenos agrícolas irrigados (e.g. arrozais) e floresta de mangal, onde estão disponíveis criadouros larvares de águas salobras, registaram-se *An. melas*, *An. coluzzii*, e *An. gambiae* com grande predominância do último (Palsson *et al.*, 1998; Gordicho *et al.* 2013). Nesta região, ocorre também uma zona de contato secundário entre *An. coluzzii*, e *An. gambiae*, com elevados níveis de hibridação (Oliveira *et al.* 2008; Marsden *et al.*, 2011; Vicente *et al.*, 2017), e que parece estar presente também noutras regiões costeiras do extremo ocidental de África, nomeadamente da Gâmbia, Senegal e Guiné-Conacri (Caputo *et al.*, 2011; Nwakanma *et al.*, 2013). Nesta região, foi também recentemente

observada a presença de *An. arabiensis*, uma espécie que parecia confinada à região mais interior norte do país (Petrarca *et al.*, 1983; Gordicho *et al.*, 2013).

Na região central da Guiné-Bissau, caracterizada por uma maior quantidade de floresta tropical, a espécie predominante parece ser *A. coluzzii*, enquanto na região interior, mais árida e com biótopos de savana, *An. gambiae* ss. e *An. arabiensis* são as principais espécies do complexo (Petrarca *et al.*, 1983; Vicente *et al.* 2017).

1.6. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762), a par de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), são os vetores mais importantes na transmissão da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika (Kraemer *et al.*, 2015). *Ae. aegypti* tem uma distribuição pantropical que terá tido origem no continente africano, donde terá sido levado pelos humanos para as Américas, bacia Mediterrânica e para a Ásia tropical e ilhas do Pacífico. A forma urbana de *Aedes aegypti aegypti*, terá evoluído a partir de *Aedes aegypti formosus*, uma população silvestre através de um único evento de subespeciação. Os habitats domésticos humanos forneceram a base ecológica para a sob especificação da subespécie altamente invasiva e epidemiologicamente importante (Brown *et al.*, 2014). São espécies adaptadas aos criadouros artificiais e isso teria sido um grande passo em direção ao comportamento sinantrópico.

Aedes aegypti apresenta comportamento sinantrópico com hábitos antropofílico e endofílico, com padrões de picada principalmente diurnos com dois picos de atividades: um entre o meio da manhã e o meio dia e um segundo ao final da tarde (Silva *et al.*, 2004).

As fêmeas grávidas depositam ovos individualmente poucos centímetros acima do nível da água, geralmente parada e limpa. Os ovos são particularmente resistentes à dessecação e podem permanecer seco e viáveis por vários meses, eclodindo quando entram em contacto com a água novamente. As larvas de *Aedes aegypti* desenvolvem-se numa variedade de criadouros, na maioria artificiais de origem humana, (Natal, 2002).

Na Guiné-Bissau, os dados sobre os *Aedes aegypti* são escassos. O primeiro de registo sobre a presença desta espécie no país foi em 2009, quando foi identificada a presença de *Ae. aegypti* nas ilhas dos Bijagós (Brown *et al.*, 2009). Entre 2015 a 2016, os *Ae. aegypti*

foram identificados em várias localidades do país pelos técnicos da INASA, depois que foram reportados quatro casos da infecção por ZIKV (INASA, não-publicado).

2. OBJETIVOS

Nos últimos anos na Guiné-Bissau, à semelhança dos países da região, tem havido alterações no paradigma das doenças transmitidas por vetores, com uma redução dos números de casos de malária, transmitida principalmente por membros do complexo *An. gambiae* e uma emergência de arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti* (e.g. Zika).

Desde 1991 após a implementação do plano geral urbanístico na cidade de Bissau, tem havido também crescimento da cidade através de processos espontâneos de autoconstruções levado a cabo pela população com baixa renda (Acioly, 1993), provocando alterações ambientais associadas ao crescimento da cidade. Nos últimos dez anos, este fenómeno ganhou mais força com aumento dos emigrantes oriundos da Comunidade Económica dos Estados da África Ocidental com destaque para as Repúblicas da Guiné e do Senegal na sua maioria comerciantes (INEC, 2009). Mais de 80% da população vivem na zona costeira do país, sendo que cerca de 70% dessa população vive da exploração dos recursos naturais (Biai, 2009). Estes fenómenos associado as alterações climáticas parece ter agravado nos últimos anos. O que não se sabe, é como estes fenómenos podem alterar a distribuição das principais espécies de mosquito vetores na Guiné-Bissau, face ao que é conhecido sobre a bioecologia destas espécies. Neste contexto, propôs-se os seguintes objetivos:

- 1- Comparar a fauna culicideológica em três áreas distintas de Bissau, Guiné-Bissau, (urbana semiurbano e rural).
- 2- Caraterizar a distribuição do complexo *An. gambiae*, e de *Ae. aegypti* nessas três áreas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. República da Guiné-Bissau

A República da Guiné-Bissau fica situada na Costa Ocidental de África, limitada a Norte pela República do Senegal, a Leste e Sul pela República da Guiné Conacri e a Oeste pelo Oceano Atlântico. A sua superfície é de 36.125 km² dos quais apenas 27.700 km² constituem a superfície emersa devido à fraca elevação do país, relativamente ao nível médio das águas do mar; as marés penetram no interior até cerca de 150 km², fazendo com que algumas áreas fiquem parciais ou totalmente inacessíveis durante parte do ano. O país é constituído por uma parte continental e uma parte insular que engloba o Arquipélago dos Bijagós, composto por cerca de 90 ilhas e ilhéus, dos quais somente 17 estão habitadas. O país está dividido administrativamente em oito regiões (Bafatá, Gabú, Biombo e Cacheu, Oio e Bolama/Bijagós, Quinara e Tombali) figura 13. Estas regiões por sua vez se dividem em trinta e seis (36) sectores, composta por tabancas (aldeias) e um sector independente, sector autónomo de Bissau (SAB) capital política, económica e administrativa do país. Em 2014, a estimativa da população apontava para 1.514.451 habitantes, sendo 52% do sexo feminino (Governo da Guiné-Bissau). O último recenseamento geral da população sugere que mais de 69% vive no meio rural.

Situada aproximadamente a meia distância entre o Equador e o Trópico de Câncer, a Guiné-Bissau tem clima tropical, caracteristicamente quente e húmido. Há duas estações distintas: a estação das chuvas e a estação seca. A estação das chuvas estende-se de meados de maio até meados de novembro, com maior pluviosidade em julho e agosto. A estação seca corresponde aos restantes meses do ano. Os meses de dezembro e janeiro são os mais frescos. No entanto, as temperaturas são muito elevadas durante todo o ano. (Governo da Guiné-Bissau, 2017).

3.2. Área de estudo

Este estudo decorreu no Setor Autónomo de Bissau (SAB) e na região de Biombo, em simultâneo com um inquérito sobre a perceção da população da Guiné-Bissau sobre os vetores de arboviroses e da malária (Ocante, não publicado), entre de setembro e novembro de 2016, de modo a coincidir com a época da maior densidade dos mosquitos. A avaliação da densidade de culicídeos foi efetuada em 3 áreas distintas (Figura 8).

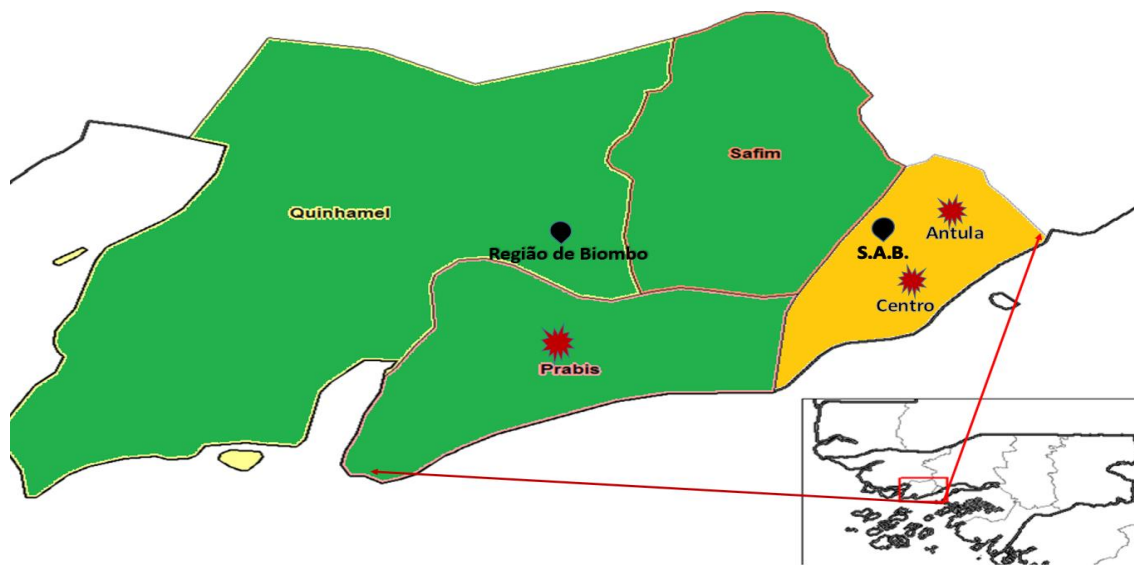


Figura 8. Mapa das regiões de Biombo e Sector Autónomo de Bissau, com as 3 áreas de colheitas assinaladas.

Adaptado:

I) - No centro da cidade de Bissau (Bairro de Setembro), Chão de pepel, Mindará, Reno, Varela e Tchada, considerados meio urbano (U); são áreas com grande densidade populacional, habitações com saneamento básico e urbanizadas, estradas alcatroadas, serviços públicos como: transportes, hospitais, centros de saúde, escolas hotéis, parques de laser, etc. São áreas com muita concentração das pessoas principalmente durante o dia. (Figura 9).



Figura 9. Área Urbana com a delimitação das localidades abrangidas no estudo. (adaptado Google earth).

II) - Antula, Lala-quema Massacobra e arredores, considerado meio semiurbano (SU). São bairros periféricos de Bissau situados a cerca de 2-4 km a Norte do centro da cidade delimitados por dois arrozais, um na zona Este e o outro na zona Oeste. É uma zona de grande densidade populacional e grande concentração das habitações, na sua maioria construída em blocos de argila e com telhados de zinco. Há presença de animais domésticos (galinhas, porcos e cabras) em algumas destas. As estradas são na generalidade em terra batida e ruas sem urbanizadas e algumas áreas de atividades agrícolas. (Figura 10).

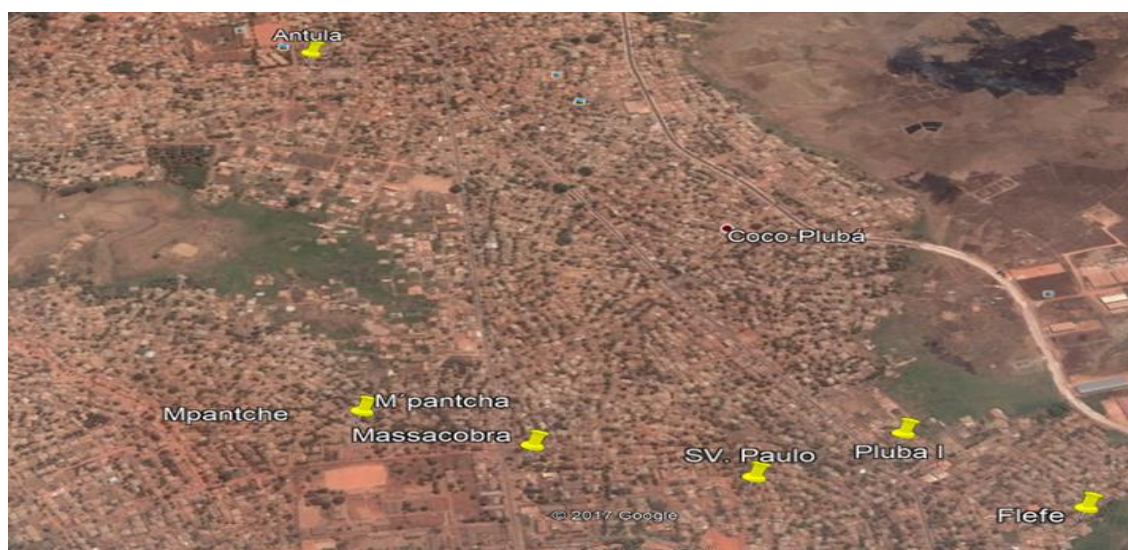


Figura 10. Área Semiurbana com a delimitação das localidades abrangidas no estudo. (adaptado Google earth).

III) - No sector de Prábis região de Biombo, meio rural (R): localizado a 20km do centro da cidade de Bissau, com grandes arrozais, vegetação densa e áreas de atividades hortícolas. Algumas habitações estão dispersas e outras aglomeradas em tabancas (aldeias). (Figura 11)

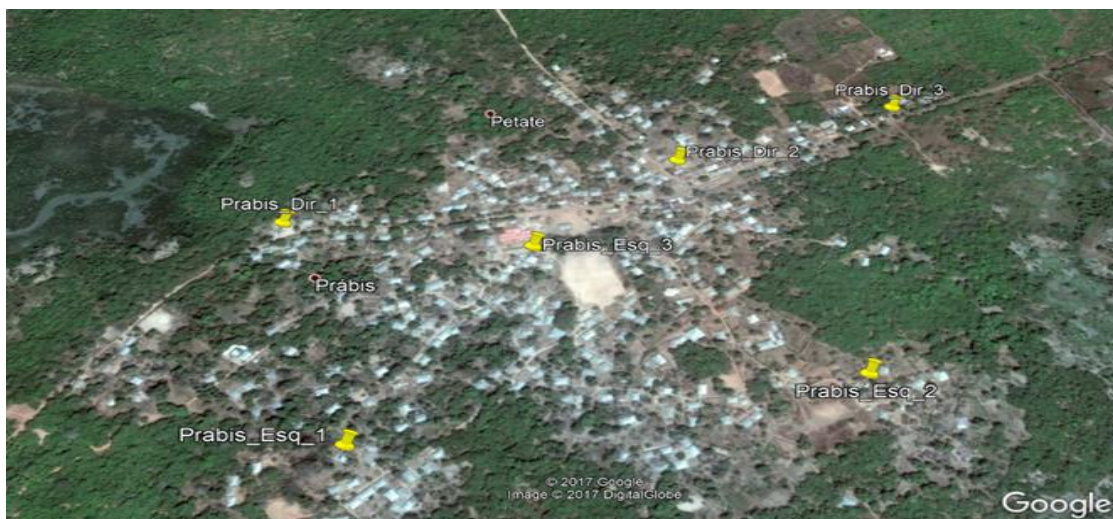


Figura 11. Área Rural com a delimitação das localidades abrangidas no estudo. (adaptado Google earth).

3.3. Colheitas entomológicas

Em cada área foi feita uma amostragem, por um período de uma semana, consistindo na prospeção larvar em colheitas de ovos e adultos, em 3 casas selecionadas, após obtenção consentimento dos proprietários. Nestas casas, foram colocadas as armadilhas tipo CDC (Sudia & Chamberlain, 1988) para colheita de adultos e Ovitrapts dirigidas principalmente para captura de ovos. As prospeções larvares foram efetuadas no ambiente doméstico e peridoméstico das casas selecionadas.

Na primeira semana, as colheitas foram efetuadas na área urbana (U), na segunda semana seguiu-se para área semiurbana (SU), e na terceira semana na área rural (R). Repetiu-se a mesma ordem e sequência das colheitas: em meio U, SU. e R, sem alterar ordem selecionada. As duas rondas consecutivas nas três áreas do estudo totalizaram 6 semanas de colheitas sem interrupção, isto é, duas (2) semanas por área para colheita de adultos, prospeção larvar e captura de ovos em 6 casas. (Fig.:9, 10 e 11).

Para além das colheitas acima mencionadas, foram também efetuadas prospeções larvares em todas as casas do inquérito (Ocante, não publicado), em criadouros domésticos e peridomésticos.

3.3.1. Colheita e armazenamento de mosquitos adultos

A colheita de mosquitos adultos foi feita através do uso de armadilhas CDC. Foram colocadas duas armadilhas por casa, uma no interior e outra no exterior, desde as 18h até às 6h do dia seguinte (mínimo de 12 horas).

As armadilhas colocadas no exterior (em árvores ou em estruturas feitas pelo Homem), ficaram suspensas perto da casa em estudo, o cilindro de acrílico fique a uma altura de cerca 1,5-2 m do solo. No interior, as armadilhas foram colocadas perto da cama (mesmo que esta tenha mosquiteiro) com o tubo de acrílico colocado um pouco acima do nível do colchão. (Figura: 12).



Figura 12. Exemplo de capturas de mosquitos com recurso a armadilhas CDC.

No dia seguinte, os mosquitos capturados foram coletados com a ajuda de um aspirador elétrico, para um tubo de colheita previamente identificado com o código da casa e da ficha de campo, a data (Anexo 1) e dia de recolha da colheita.

Os mosquitos coletados foram transportados vivos em caixas refrigeradas (caixa de esferovite com termoacumuladores) para o laboratório do INASA, onde foram mortos por congelação e colocados em tubos Falcon (15mL) com sílica gel e algodão também

identificado com o número da ficha de campo e dia de colheita, que posteriormente são transportados para IHMT (Lisboa).

3.3.2. Colheita de imaturos

As prospeções larvares foram feitas com recurso a caços e ou pipetas de Pasteur, dependendo do tipo de criadouro. Os caços foram normalmente usados para colheitas em corpos de água como bidões, pântanos, valas, margens de riachos e arrozais. O caço foi gentilmente introduzido na água num ângulo de 45° para evitar o distúrbio e arrastar a parte superficial da água, tendo sempre o cuidado de não derramar a água enquanto se levantava o caço. O conteúdo foi despejado numa bandeja de fundo claro, de modo a conseguir visualizar-se bem as larvas. Foram anotadas na ficha de campo o nº de caços efetuado. Um criadouro foi considerado negativo depois de se fazer cinco tentativas de colheita com o caço, sendo estes todos negativos.

Em pequenas coleções de água, recipientes, axilas e cavidades nas plantas, onde a introdução de um caço ou concha é impossível, as colheitas das larvas foram efetuadas diretamente para o frasco de transporte com auxílio de uma pipeta. As larvas são colhidas diretamente para um tubo Falcon 50mL com álcool a 80% ou 96% (os resíduos de água do criadouro diluem o álcool até 70%-80%), tendo o cuidado de transferir a menor quantidade possível de água. O tubo Falcon com as larvas são etiquetados, com o número/código da respetiva ficha de campo e data da colheita. Nestes casos foram apontados o tempo que estivermos a colher as larvas.

As colheitas de ovos foram efetuadas com Ovitraps, uma armadilha mais dirigida aos mosquitos do género *Aedes*. Esta é constituída por:

- Balde preto com água;
- Régua com papel rugoso vermelho, de modo a fazer o contraste de cores, que atrair os *Aedes sp.* a colocarem os seus ovos no papel, junto à linha de água. (figura.:13).



Figura 13. Exemplo de uma armadilha ovitrap usada neste estudo. Fonte: foto gentilmente cedida por Gonçalo Seixas.

As ovitraps foram colocadas no interior e exterior das 3 casas (total de 6 ovitraps por área) em simultâneo com as CDC. As armadilhas de ovos foram colocadas por um período de uma semana. No exterior da habitação, as ovitraps foram colocadas num local abrigado da luz direta e da chuva. No interior foram colocadas num canto escuro. Depois de uma semana, o papel foi retirado da régua e colocado para secar no laboratório durante 24h, são colocados depois dentro de um saco de plástico, devidamente identificado com o número da ficha de campo (anexo), com a indicação da localização da armadilha (interior ou exterior) e a data da recolha da colheita. As águas dos baldes são inspecionadas para verificar a presença de larvas de outras espécies de mosquitos (anofelíneos e género *Culex*). É frequente os mosquitos do género *Culex* colocarem os seus ovos diretamente na água destas armadilhas. Por fim, os balde são lavados antes de serem levados para outra área, para não haver transporte accidental de ovos entre as localidades.

3.4. Identificação morfológica

Todos os mosquitos adultos foram identificados morfológicamente, segundo género e espécie, e separados em microtubos de 1,5ml com sílica gel e algodão. A identificação foi feita com recurso as chaves de identificação morfológica de Gillies & Coetzee 1987; e Ribeiro & Ramos 1995.

As larvas foram transferidas para placa de Petri de 150 x 20 mm, foram identificadas até ao género, e transferidas individualmente para novo tubo microtubos de 1,5ml com álcool 98%. São atribuídos novos códigos e armazenadas a temperatura ambiente.

Os ovos foram cuidadosamente retirados da embalagem, identificados até espécie e contabilizados. Antes de abrir a embalagem seguinte, a bancada e a bandeja foram cuidadosamente limpas com álcool 96% e os papéis colocados no lixo para inceneração. As embalagens são seladas de novo e armazenados num local seco e seguro.

3.5. Extração de ADN de mosquitos do complexo *An. gambiae*

Os 20 primeiros indivíduos do complexo *An. gambiae* de cada coordenada geográfica foram selecionados para extração de ADN com o kit comercial NZYtech genes & enzymes), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo: 1). O DNA extraído foi eluído em 100 µl de Buffer NE e conservado a 4°C até ser posteriormente analisado. A extração de ADN foi feita em grupos de 29 mosquitos com um controlo negativo (branco) isto é, sem material biológico, de modo a despistar possíveis contaminações.

As extrações de ADN dos demais indivíduos foram feitas com o método adaptado de Collins et al, 1988. Homogeneizou-se cada indivíduo em 100µl de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M pH 8,0; NaCl 0,08M; EDTA 0,06M pH 8,0; SDS 0,5%, sacarose 0,16M em ddH₂O), em microtubos de 1,5ml. Para inibir a atividade de ADNases, seguiu-se uma incubação a 65°C durante 30 minutos. Precipitaram-se as proteínas com a adição de 14µl de uma solução de acetato de potássio 8M e incubação em gelo durante 30 minutos. Depois, realizou-se uma centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Procedeu-se à precipitação do ADN com 200µl de etanol absoluto seguido de uma incubação a -20°C durante 1 hora. Submeteram-se as amostras a uma centrifugação de 12000 rpm durante 15 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Cada pellet de ADN foi lavado com 200µl de etanol a 70%, seguindo-se uma centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os resíduos de etanol evaporados em estufa a 37 °C durante a noite. Por fim, suspendeu-se o ADN com 100µl de ddH₂O e 100µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Durante o processo de extração de ADN com este método, foram também utilizados controlos negativos (sem material biológico) para despistar possível contaminação.

3.6. Identificação de espécies do complexo *An. gambiae*

Foi utilizada uma técnica PCR-RFLP descrita por Fanello et al. (2002), aqui designada por (IGS_PCR), para identificar a espécie do complexo *Anopheles gambiae*. Utilizou-se um primer forward universal (UN), comum a todas as espécies do complexo, e um primer reverse específico para cada uma das seguintes espécies: *An. gambiae* ss. (GA), *An. arabiensis* (AR), e *An. melas* (ML) (Scott et al., 1993). Estes primers permitem a amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos, específicos de espécie, na região intergenic spacer (IGS) do ADN ribossômico (rADN). Seguidamente, os produtos amplificados foram sujeitos a uma restrição enzimática com a enzima Hha I, permitindo a distinção entre *An. coluzzii* e *An. gambiae* ss. (anteriormente formas M e S, Coetzee et al., 2013), bem como a deteção de híbridos entre as duas espécies (Fanello et al., 2002).

Foi preparada uma mistura de reação para um volume total de 10µl composta por: 1µl de ADN molde (diluído 1:10 a partir do ADN stock); Tampão Green GoTaq® Flexi (Promega) a 1X; 2,5mM de MgCl₂ (Promega); 0,2mM de dNTP (Promega); 0,83µM de primer UN [5'–GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT–3']; 0,42µM de primer GA [5'–CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT–3']; 1,2µM de primer AR [5'–AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA–3']; 0,83µM de primer ML [5'–TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA–3'] e 0,25U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). A reação de PCR realizou-se em 30 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de annealing a 50°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Seguiu-se a extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado foi sujeito a restrição com a enzima HhaI por incubação a 37°C durante 4 horas. Cada mistura de reação, de 20µl de volume total, foi composta por 10µl de produto amplificado; Tampão C (Promega) a 1X; 0,1mg/ml de BSA (Promega) e 2U de enzima Hha I (Promega). As espécies *An. coluzzii*, *An. melas* e *An. arabiensis*, apresentam um padrão caracterizado por uma única banda com 367pb, 435pb e 292pb, respetivamente. *Anopheles gambiae* caracteriza-se por um padrão de bandas composto por dois fragmentos (257pb e 110pb), devido à presença do local de restrição da enzima *Hha I*.

3.7. Identificação de *An. gambiae* e *An. coluzzii* por SINE-PCR

Um segundo ensaio de PCR, aqui designado por SINE_PCR foi usado para a diferenciação entre *An. gambiae* e *An. coluzzii* (Santolamazza *et al.*, 2008a). O SINE_200 (Short INterspersed Element 200) é um retrotransposão que se apresenta fixo em *An. coluzzii* e ausente em *An. gambiae*, permitindo a obtenção de uma banda de PCR distinta para cada espécie e para os híbridos. Efetuou-se uma mistura de reação, com um volume total de 25 µl, composta por 1µl de ADN molde (não diluída); Tampão Green GoTaq® Flexi (Promega) a 1X; 5mM de MgCl₂ (Promega); 0,32mM de dNTP (Promega); 0,072µM de cada primers, S200-f [5'–TCG CCT TAG ACC TTG CGT TA–3']; 0,072µM do primer S200-r [5'–CGC TTC AAG AAT TCG AGA TAC–3']; e 0,9U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). A reação de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguindo-se 35 ciclos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 94°C, annealing a 54°C por 30 segundos e 1 minuto de extensão a 72°C. Seguiu-se um período de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados resultantes consistem em 479 pb para *An. coluzzi* e 249 pb para *An. gambiae*.

Deteção de fragmentos em gel de agarose.

Os produtos de PCR resultantes do protocolo de SINE-PCR e os produtos restrição resultantes dos protocolos de IGS-PCR, foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2% (Seakem® LE Agarose, Lonza) em SGTB 1X (SGTB buffer 20X,) corado com brometo de etídeo 10mg/ml (Sigma-Aldrich®). Foram aplicados no gel 5 µl e 20µl do produto amplificado obtido por SINE_PCR e IGS_PCR, respetivamente; 5µl de marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific™) e os controlos positivos e negativo. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100V durante 90 minutos e as bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e fotografadas num sistema Uvidoc (Uvitec™).

3.8. Análise estatística e tratamento dos resultados

As bases de dados com informações das espécies de mosquitos foram processadas em ficheiros Microsoft Excel® MSO (16.0.4266.1001). Foi utilizado este software para calcular percentagens e médias aritméticas. A comparação estatística de tabelas de contingência 3x3 foram efetuadas utilizando o software IBM-SPSS versão 24 (Statistical

Package for the Social Sciences), onde foi utilizado o teste de McNemar-Bowker, que determinou a medida de concordância Kappa, rejeitando-se a hipótese nula com nível de significância inferior a 0,0001.

Para se caracterizar a diversidade culicideológica de cada área estudada calcularam-se a riqueza de espécies (*i.e.*, número de espécies identificadas em cada área) e o índice de Shannon. O índice de Shannon é um índice de diversidade que combina a riqueza de espécies com a equidade, medida pela abundância relativa de cada espécie. Quanto maior for o valor H' maior a diversidade biológica de uma determinada comunidade. (Muturi et al., 2006). Neste calculo, foram incluídos apenas os indivíduos identificados até a espécie.

$$\text{Índice de Shannon, } H' = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

Para as larvas foram utilizados os índices que são comumente usados para monitorizar os níveis de infestação por *Ae. aegypti*, que são (Bowman *et al.*, 2014,): índice de habitação ou de casa (IH), índice de contentor ou recipientes (IC) e índice de Breteau (IB).

Onde:

IH- é a percentagem de casas infestadas com larvas e/ou pupas de *Ae. aegypti* (IH=número de casas infestadas/Número de casas prospectadas x 100); há risco de epidemia quando $IH > 4$. IC- é a percentagem de recipientes com água infestados com larvas e/ou pupas (IC=Número de contentores positivos/Número de contentores com água x 100), há risco de epidemia quando $IC > 3$. IB- é o número de contentores positivos por 100 casas inspecionadas (IB=Número de contentores positivos/Número de casas prospectadas x 100); há risco de epidemia quando $IB > 5$. (Bowman *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. Adultos

Foram capturados 925 culicídeos adultos no interior e exterior das habitações com armadilhas CDC em 18 localidades. Todos os mosquitos capturados foram identificados morfológicamente e foi possível identificar 23 espécies diferentes. Entre as espécies capturadas, 26,5% pertenciam ao *Culex quinquefasciatus*, 26,4% *Anopheles gambiae*, 19,5% *Culex thalassius*, 6,6% *Mansonia uniformis*, 6,1% *Anopheles coluzzii*, 4,2% *Anopheles melas* e 3,0% *Anopheles arabiensis*.

A distribuição de espécies e abundância de mosquitos variou consoante a área estudada.

A área Rural apresentou uma maior abundância de mosquitos, com 61,1% do total colhido a pertencer ao complexo *An. gambiae* (34,9%) seguido de *Cx. thalassius* (27,6%) e *Cx. quinquefasciatus* (10,6%). Entre as espécies dos mosquitos capturados nesta região, foram identificados dois indivíduos que pertencem à espécie *Uranotaenia connali*, nunca antes descrita na Guiné-Bissau. Nesta área, foram amostradas um total de 18 espécies (Índice de Shannon, $H' = 1,862$).

Na área Semiurbana, foram capturados 28,3% do total de mosquitos colhidos, na sua maioria *Cx. quinquefasciatus* (48,8%), seguido complexo de *An. gambiae* com (15,8%) e *Mansonia uniformis* (11,2%). Um total de 20 espécies foi capturado nesta área (Índice de Shannon, $H' = 1,771$).

Na área Urbana, foram capturados 10,6% do total de mosquitos amostrados e, tal como na região semiurbana, a maioria pertenciam à espécie *Cx. quinquefasciatus* (58,8%), seguidos de *Mansonia uniformis* com (8,8%) e *Anopheles arabiensis* (7,5%). Nesta área, foram capturadas 10 espécies diferentes (Índice de Shannon, $H' = 1,504$).

Tabela 1. Numero e frequência das espécies de mosquito capturados por área (urbana semiurbana e rural).

| Espécies | U | | SU | | R | | Total | |
|---|-----------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>Aedes (Aedimorphus) irritans</i> | - | - | 1 | 0,5 | 2 | 0,4 | 3 | 0,4 |
| <i>Aedes (Aedimorphus) punctothoracis</i> | - | - | - | - | 3 | 0,6 | 3 | 0,4 |
| <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> | 5 | 6,3 | 3 | 1,4 | 1 | 0,2 | 9 | 1,2 |
| <i>An.squamosus cydippis</i> | 1 | 1,3 | 1 | 0,5 | 3 | 0,6 | 5 | 0,7 |
| <i>Anopheles arabiensis</i> | 6 | 7,5 | 12 | 5,6 | 5 | 1,1 | 23 | 3,0 |
| <i>Anopheles coluzzii</i> | 3 | 3,8 | 3 | 1,4 | 40 | 8,6 | 46 | 6,1 |
| <i>Anopheles gambiae</i> | 4 | 5,0 | 34 | 15,8 | 162 | 34,9 | 200 | 26,4 |
| <i>Anopheles maculopalpis</i> | - | - | 1 | 0,5 | - | - | 1 | 0,1 |
| <i>Anopheles melas</i> | - | - | 6 | 2,8 | 26 | 5,6 | 32 | 4,2 |
| <i>Anopheles pharoensis</i> | - | - | 1 | 0,5 | 3 | 0,6 | 4 | 0,5 |
| <i>Anopheles pretoriensis</i> | - | - | - | - | 1 | 0,2 | 1 | 0,1 |
| <i>Anopheles rivulorum</i> | - | - | 1 | 0,5 | - | - | 1 | 0,1 |
| <i>Anopheles rufipis</i> | - | - | 1 | 0,5 | - | - | 1 | 0,1 |
| <i>Anopheles tenebrosus</i> | - | - | 1 | 0,5 | - | - | 1 | 0,1 |
| <i>Anopheles ziemanni</i> | 1 | 1,3 | - | - | 13 | 2,8 | 14 | 1,8 |
| <i>Cx. bitaeniorhynchus</i> | 1 | 1,3 | 1 | 0,5 | - | - | 2 | 0,3 |
| <i>Cx. ethiopicus</i> | - | - | 1 | 0,5 | 1 | 0,2 | 2 | 0,3 |
| <i>Cx. quinquefasciatus</i> | 47 | 58,8 | 105 | 48,8 | 49 | 10,6 | 201 | 26,5 |
| <i>Cx. thalassius</i> | 5 | 6,3 | 15 | 7,0 | 128 | 27,6 | 148 | 19,5 |
| <i>Cx. tigripes/subgene.mtzia</i> | - | - | 1 | 0,5 | - | - | 1 | 0,1 |
| <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> | - | - | 2 | 0,9 | - | - | 2 | 0,3 |
| <i>Mansonia africanus</i> | - | - | 1 | 0,5 | 4 | 0,9 | 5 | 0,7 |
| <i>Mansonia uniformis</i> | 7 | 8,8 | 24 | 11,2 | 19 | 4,1 | 50 | 6,6 |
| <i>*Ur. pseod. mashonaensis</i> | - | - | - | - | 2 | 0,4 | 2 | 0,3 |
| <i>Uranotaenia connali</i> | - | - | - | - | 2 | 0,4 | 2 | 0,3 |
| Total Geral | 80 | 10,6 | 215 | 28,3 | 464 | 61,1 | 759 | 100,0 |

Legenda: U: Urbano; SU: Semiurbano; R: Rural **Uranotaenia pseodoficalbia mashonaensis*;

A Figura 14, apresenta a variação relativa de dos principais géneros de culicídeos com importância médica (*Anopheles* sp. *Culex* sp. e *Aedes* sp.) consoante a área estudada, verificando-se uma inversão das abundâncias relativas, os *Culex* sp. mais abundante na área urbana e os *Anopheles* sp. predominam na área rural.

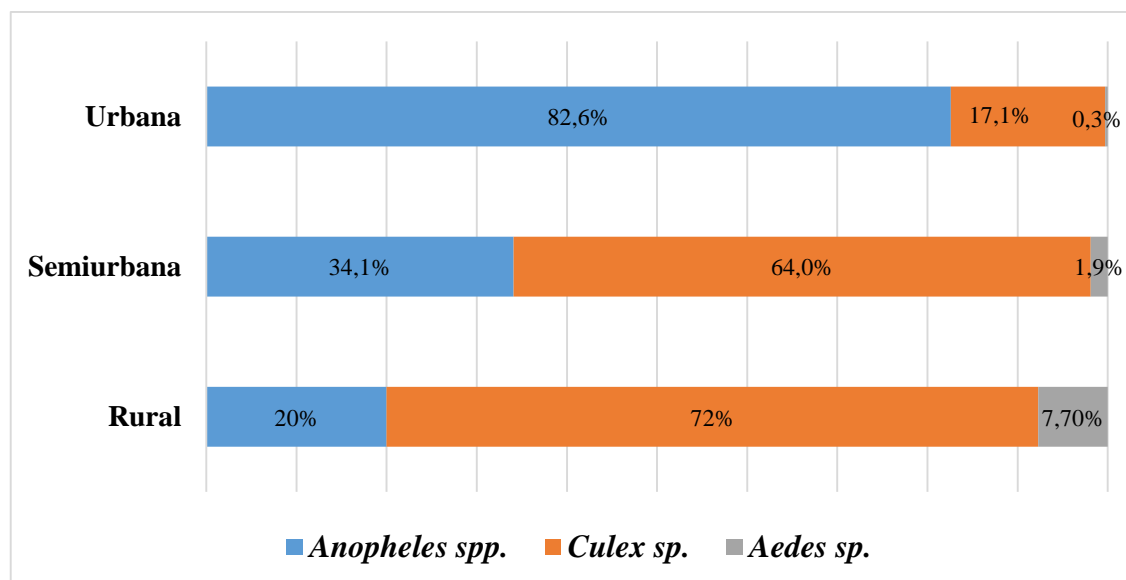


Figura 14. Variação dos principais géneros de culicídeos com importância médica por área de estudo.

4.1.1. Identificação molecular e distribuição do complexo *Anopheles gambiae*

Dos 441 mosquitos identificados morfologicamente como pertencentes ao complexo *An. gambiae*, verificou-se que *An. gambiae* s.s. foi a mais frequente, com 45,4%; seguido *An. coluzzii* com 10,4%; *An. melas* com 7,3% e *An. arabiensis* com 5,2% (Tabela: 2). Híbridos entre *An. coluzzii* e *An. gambiae* constituíram 31,7% da amostra analisada. Na área Urbana não foram capturados *An. melas*.

A abundância e distribuição das espécies do complexo *An. gambiae* variou consoante as áreas estudadas. Na área rural, onde se capturaram 77,3% do total de mosquitos pertencentes a este complexo, *An. gambiae* s.s. foi a espécie mais abundante (47,5%) e *An. arabiensis* foi a menos abundante (1,5%). Na área Semiurbana, onde se capturaram 18,4% da amostra total deste complexo, *An. gambiae* s.s permanece a espécie mais abundante (42,0%), mas verificou-se um aumento da frequência de *A. arabiensis* (14,8%)

e *An. coluzzii* foi a espécie menos representada (3,7%). Em contraste, *An. arabiensis* foi a espécie mais abundante na área urbana (31,6%). Nesta área, foram capturados apenas 19 indivíduos (4,3% da amostra total) e não foram identificados *An. melas* (Tabela 2). A proporção de híbridos entre *An. coluzzii* e *An. gambiae* foi idêntica entre as áreas (~32%).

Tabela 2. Distribuição (em percentagem) dos indivíduos do complexo *An. gambiae* s.l. capturados, por área.

| | <i>An. arabiensis</i> | <i>An. coluzzii</i> | <i>An. gambiae</i> | <i>An. melas</i> | Híbrido | Total |
|-------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|---------|-------|
| Urbana | 31,58 | 15,79 | 21,05 | 0,00 | 31,58 | 19 |
| Semiurbana | 14,81 | 3,70 | 41,98 | 7,41 | 32,10 | 81 |
| Rural | 1,47 | 11,73 | 47,51 | 7,62 | 31,67 | 341 |

4.2. Larvas

4.2.1. Dados gerais e distribuição por área

Foram inspecionadas 544 casas e foi possível prospear 561 criadouro (307 com água e 254 sem água), tanto no interior (N= 16) como exterior (N=544) dessas casas. 1065 larvas foram capturadas em 68 dos 307 recipientes identificados com água nas três áreas.

A maioria das larvas capturadas foram de *Ae. aegypti* (98,7%) (Nº 1052), tendo-se somente identificado 8 larvas *Culex*. sp. (0,8%) e 5 larvas que foram identificadas como pertencendo ao do género *Aedes* sp. mas que não foi possível determinar a espécie.

Das 1052 larvas de *Ae. Aegypti*, 39,4% foram capturados na área urbana, 31,1% na área rural e 29,2 na área semiurbana.

Foram calculados os índices de habitações (IH), recipientes (IR) e de Breteau (IB) para as três áreas, cujos resultados se apresentam na Tabela 3.

Tabela 3. Índices larvares para *Aedes aegypti*, por área de estudo.

| Áreas | Índice de Habitações (IH>4) | Índice de Recipientes (IR>3) | Índice de Breteau (IB>5) |
|------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Urbana | 13,3 | 23,2 | 14 |
| Semiurbano | 13,1 | 21,8 | 13 |
| Rural | 9,3 | 20,0 | 9 |
| Total | 11,9 | 21,8 | 12 |

Em parêntesis: valores a partir dos quais há risco de epidemia por arbovírus.

Nas três áreas de estudo, os valores obtidos para os índices larvares foram sempre superiores ao limite a partir do qual se considera a presença de risco da ocorrência de uma epidemia por arbovírus (Bowman *et al.*, 2014). De um modo geral, estes valores foram comparáveis entre as áreas urbana e semiurbana, sendo ligeiramente inferiores na área rural.

No que diz respeito ao tipo de criadouros encontrados, pneus velhos, blocos de cimento e sacos de plástico foram os que apresentaram IR mais elevados (Tabela 4). Na área rural, os pneus velhos (17,64%) constituíram o principal criadouro positivo para *Ae. aegypti* (36,00%), seguido dos baldes (24,00%). Os pneus velhos positivos foram também o principal criadouro de *Ae. aegypti* na área semiurbana (28,00%), juntamente com blocos de cimento (24,00%). Já na área urbana, o principal criadouro de *Ae. aegypti* foram bidões de armazenamento de água (35,29), seguidos dos pneus velhos (17,65%).

Tabela 4. Tipo de criadouros prospectados nas áreas de estudo.

| | | | | | Criadouros positivos | | |
|-----------------------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------|-----------------------------|-----------|----------|
| Tipo de criadouros | Total | C/agua | Positivo | IR | R | SU | U |
| Baldes | 65 | 26 | 9 | 34,62 | 6 | 2 | 1 |
| Bidões | 77 | 38 | 10 | 26,32 | 3 | 1 | 6 |
| Blocos de cimento | 32 | 24 | 10 | 41,67 | 2 | 6 | 2 |
| Caixotes de lixo | 35 | 4 | 0 | 0,00 | - | - | - |
| Depósitos de água | 24 | 14 | 1 | 7,14 | - | 1 | - |
| Latas velhas | 65 | 27 | 5 | 18,52 | 2 | 2 | 1 |
| Outros | 76 | 33 | 8 | 24,24 | 3 | 3 | 2 |
| Pneus velhos | 47 | 33 | 19 | 57,58 | 9 | 7 | 3 |
| Pratos | 20 | 11 | 1 | 9,09 | - | 1 | - |
| Sacos de plástico | 26 | 11 | 4 | 36,36 | - | 2 | 2 |
| Valas/buracos no pavimento | 93 | 46 | 0 | 0,00 | - | - | - |

IR: Índice de Recipientes; R: Rural; SU: Semiurbana; U: Urbana.

4.3. Ovos

Durante as 6 semanas do estudo, foram utilizadas 36 ovitraps, tendo-se capturado 1948 ovos, 73,0% no exterior e 27,0% no interior de 18 habitações. Os ovos foram identificados morfológicamente até a espécie, tendo-se verificado que todos os 1948 ovos eram de *Aedes aegypti*.

Tabela 5. Distribuição dos ovos de *Aedes aegypti* capturados e proporção interna/externa.

| Região | Interior | Exterior | Total | % Interior |
|-------------------|-----------------|-----------------|--------------|-------------------|
| Urbana | 61 | 551 | 612 | 9,97 |
| Semiurbana | 404 | 566 | 970 | 41,65 |
| Rural | 64 | 302 | 366 | 17,49 |
| Total | 529 | 1419 | 1948 | 27,16 |

Da amostra total de ovos, perto de 50% foi coletada na área semiurbana e apenas 18,7% foi coletada na área rural. Foi na área semiurbana que se verificou a maior proporção de ovos capturados no interior das habitações, cerca de 2 a 4 vezes superior à proporção observada nas áreas rural e urbana, respetivamente.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo, verificou-se que, da área rural para área urbana, há uma diminuição da riqueza de espécies. Há uma maior riqueza de espécies na área rural, embora em termos de abundância verificou-se a dominância dos *An. gambiae* sl., que constituiu mais de 50% do total de indivíduos capturados nesta área. Em contraste, apesar de haver menor riqueza de espécies na área urbana, a abundância relativa é mais homogênea, isto é, há maior equidade, o que contribui para a obtenção de um índice de diversidade de Shannon comparável com área semiurbana ou rural. Deste modo, a biodiversidade nas três áreas estudadas acaba por ser comparável. Não há dados de estudos anteriores para comparar com os resultados observados neste estudo, mas, provavelmente, o facto de a área de estudo ser relativamente pequena (aproximadamente 12 km²) pode ter contribuído para esta aparente homogeneidade entre áreas.

Outro fator que poderá ter influenciado estes resultados foi o próprio método de colheita. As armadilhas luminosas CDC são direcionadas a mosquitos com hábitos noturnos, o que poderá resultar numa sub-representação de mosquitos com hábitos diurnos.

Observou-se que *An. arabiensis*, apresentou a maior abundância na área urbana. Esta espécie é mais adaptada a condições de aridez (della Torre *et al.*, 2005; Diabaté *et al.*, 2008; Costantini *et al.*, 2009). A maior abundância na área urbana possivelmente reflete a maior adaptação a habitat larvares permanentes, de natureza artificial (feitos pelo Homem) (Muturi *et al.*, 2008). É importante referir que, relativamente a estudos anteriores (Petrarca *et al.*, 1983; Gordicho *et al.*, 2014) *An. arabiensis* nunca tinham antes sido identificados no centro urbano de Bissau e, pela primeira vez, foram capturados mosquitos adultos em armadilhas colocadas no exterior das habitações na área de Antula.

An. gambiae s.s. é uma espécie característica da área rural, que explora habitats larvares temporários (Gimonneau *et al.*, 2011 e Kamden *et al.*, 2012). Coincidentemente, foi a mais abundante neste estudo, principalmente na área rural, como também relatado em estudos anteriores na região (e também no leste de Senegal (Caputo *et al.*, 2008). Já *An. coluzzii*, habitualmente associado a criadouros permanentes como arrozais, ocorre em maior abundância na área rural, mas também na área urbana. Esta ocorrência urbana, explorando criadouros permanentes, com elevado grau de matéria orgânica, foi recentemente descrita nos Camarões e no Gana por (Kamdem *et al.*, 2012) o que poderá

consistir numa adaptação recente resultante de alterações ambientais de natureza antropogénica (Kamdem *et al.*, 2012). Finalmente, *An. melas*, espécie essencialmente costeira, típica de regiões de mangal com criadouros de água salobra, foi mais frequente nas áreas semiurbana e rural como descrito anteriormente (Jaenson *et al.*, 1994; Palsson *et al.*, 2004; Dabiré *et al.*, 2008).

As colheitas de imaturos são consideradas as mais representativas da biodiversidade de culicídeos (Hoshi *et al.*, 2014). No entanto, tal não foi o caso neste estudo, na medida em que praticamente só foram capturados exemplares imaturos de *Ae. aegypti*. Isto possivelmente porque, embora se tenha prospectado uma variedade de habitats larvares, as colheitas de imaturos foram efetuadas essencialmente no peridomicílio, sendo assim direcionadas à amostragem de *Ae. aegypti*.

Como esperado, foi observada uma maior abundância larvar de *Ae. aegypti* nas áreas urbana e semiurbana. Já foi demonstrado que esta espécie está preferencialmente adaptada a estes meios (Natal, 2002). Os índices larvares, embora ligeiramente inferiores no rural, apresentaram valores sempre acima do que se considera o limiar de risco de ocorrência de uma epidemia de arbovírus (Bowman *et al.*, 2014). No entanto, para que ocorra uma epidemia, é necessário ter em consideração outros fatores, tais como a introdução do arbovírus, as densidades dos mosquitos adultos (*Aedes s.p.*), ou a interação vetor-hospedeiro, podem influenciar a relação entre os índices larvares e o risco de epidemia. Ainda assim, já foi demonstrada a utilidade destes índices entomológicos na identificação de áreas geográficas com elevado risco de transmissão da dengue (Sanchez *et al.*, 2006).

Como já tinha sido referido, este é um estudo pioneiro sobre os vetores de arboviroses no país, pelo que serão necessários mais estudos para verificar a aplicabilidade destes índices na previsão de futuras epidemias ou na aplicação de medidas de controlo vetorial, nesta região. Em 2016, foram reportados três casos de Zika no país, embora ainda não tenham sido reportados casos de outras de arboviroses apesar de terem ocorrido epidemias nos países vizinhos, nomeadamente, de Febre Amarela na Guiné Conacri, (1987) e no Senegal (1995) (WHO, 1998); Dengue, (2009) e Zika, (2016) em Cabo-Verde, (WHO, 2016).

De um modo geral, a crescente urbanização parece não ter provocado grandes alterações na distribuição dos principais vetores na Guiné-Bissau. *An. gambiae* continua rural face ao que se conhecia e os *Ae. aegypti* urbano. A ausência de dados anteriores sobre a

distribuição das *Aedes* no país dificulta essa leitura. Mas, para os indivíduos do complexo *An. gambiae* é evidente algumas alterações. *An. arabiensis*, foram mais abundantes no centro urbano e talvez *An. coluzzii*, que também está bastante representado no meio urbano. Parece, assim haver uma alteração de distribuição face ao esperado (embora não hajam dados temporais para a área urbana), que poderá ter sido influenciada pelo aumento da urbanização na região do estudo.

Este estudo, contém dados importantes sobre vetores das arboviroses que até então, pouco se conhecia no país. É o primeiro estudo com informações sobre a distribuição dos *Aedes aegypti* na cidade de Bissau e Prábis, e que vão servir de base para compreender melhor, o comportamento desse vetor na Guiné-Bissau.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abissa I., Fernandes R, Prof P, Manuel J, Gonçalves DS. Efeitos das Alterações climáticas na Zona Costeira Noroeste da Guiné-Bissau Júri. 2009.
- Acioly Jr., C.C.(1993). "Planejamento Urbano, Habitação e Autoconstrução: experiências com urbanização de bairros na Guiné-Bissau", Publikatieburo Press, Faculty of Architecture, Delft University of Technology The Netherlands. 189 pp.
- Almeida, P.G., Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta Med Port.* 2011;24(6):961–74. 967pp
- Amarasinghe, A., Kuritsk, J.N., Letson, G.W., Margolis, H.S. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1349–1354.
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., Corbellino, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1).
- Arez A.P., Pinto J., Pålsson K., Snounou G., Jaenson T.G.T. & Rosário V.E., 2003. Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68:161– 168.
- Bowman, L.R., Runge-Ranzinger, S., McCall, P.J.. Assessing the Relationship between Vector Indices and Dengue Transmission: A Systematic Review of the Evidence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5).
- Braga, I., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia E Serviços De Saúde*, 16(2), 113-118. Retrieved from http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000200006
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS [Internet]. 2017. 136 p. Available from: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/28/af_zika_28mar17_isbn_web.pdf

- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., ... Powell, J. R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 68(2), 514–525. <http://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Brown, J.E., McBride, C.S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2011;278(1717):2446–54. Available from:<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2010.2469>
- Cao-Lormeau, V.M., Roche, C., Teissier, A., et al. *Virus Zika*, Polinésia Francesa, Pacífico Sul, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014 ; 20: 1085 - 1086
- Caputo, B., Nwakanma, D., Jawara, M., Adiamoh, M., Dia, I., Konate, L., Petrarca, V., Conway, D.J. & della Torre, A., 2008. *Anopheles gambiae* complex along The Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s.. *Malaria Journal*, 7:182.
- Caputo, B., Santolamazza, F., Vicente, J.L., Nwakanma, D.C., Jawara, M., Palsson, K., Jaenson, T., White, B.J., Mancini, E., Petrarca, V., Conway, D.J., Besansky, N.J., Pinto J, & della Torre, A., 2011. The “far-west” of *Anopheles gambiae* molecular forms. *PLoS ONE*, 6(2), e16415.
- Carabali, M., Hernandez, L.M., Arauz, M.J., Villar, L.A., Ridde, V. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; 2015;15(1):301. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1058-x>.
- CDC, Comparison between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. 2012; Available from: <http://www.cdc.gov/dengue/resources/30Jan2012/comparison dengue vectors.pdf>.
- CDC. Geographic Distribution;Where Has Chikungunya Virus Been Found? 2017; Available from: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>
- Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R., della Torre A., Coulibaly M.B. & Besansky N.B., 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619:246–274.

- Coetzee, M. (2017). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. - PubMed - NCBI . Ncbi.nlm.nih.gov. Retrieved 26 October 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131476/>.
- Coetzee, M., Craig, M. & le Sueur, D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today*, 16(2), pp.74-77.
- Coetzee, M., Craig, M., Le Sueur, D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today*. 2000;16(2):74–7.
- Collins, F.H. & Paskewitz, S.M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5(1), pp.19.
- Coluzzi, M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology*, 10(1), pp.9-18.
- Coluzzi, M., 2002. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. *Science*, 298(5591), pp.115-117.
- Coluzzi, M., Petrarca, V. & di Deco, M.A., 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bolletino di zoologia*, 52:1-2, 45-63.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V. & di Deco, M.A., 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), pp.483-497.
- Costantini C, Ayala D, Guelbeogo WM, Pombi M, Some CY, Bassole IH, et al. Living at the edge: biogeographic patterns of habitat segregation conform to speciation by niche expansion in *Anopheles gambiae*. *BMC Ecol* [Internet]. 2009;9(1):16. Available from: <http://bmcecol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6785-9-17>
- Dabiré K.R., Diabaté A., Agostinho F., Alves F., Manga L., Faye O. & Baldet T., 2008. Distribution of the members of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock-down resistance gene (*kdr*) in Guinea-Bissau, West Africa. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 101:119–123

- Dean, S., Sunter, J.D., Wheeler, R.J. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. Trends Parasitol [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;33(2):80–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.009>
- Deitz KC, Athrey, G.A., Jawara, M., Overgaard, H.J., Matias, A., Slotman, M.A. Genome-Wide Divergence in the West-African Malaria Vector *Anopheles melas*. G3: Genes|Genomes|Genetics [Internet]. 2016;6(9):2867–79. Available from: <http://g3journal.org/lookup/doi/10.1534/g3.116.031906>.
- della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V. & Coluzzi M., 2001. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. Insect Molecular Biology, 10:9–18.
- della Torre A., Tu Z. & Petrarca V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35:755–769
- della Torre, A., Merzagora, L., Powell, J.R., Coluzzi, M., 1997. Selective introgression of paracentric inversions between two sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. Genetic Society of America, 146(1), pp.239-244.
- della Torre, A., Tu, Z. & Petrarca, V., 2005. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35(7), pp.755-769.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J. & Knirsch, C., 2000. The Malaria. In: Parasitic Diseases. 5th Edition. Apple Trees Productions, New York, pp.50-68.
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Heidenberger, K., Crawford, J., Lamp, W.O., Culler, L.E. & Lehmann, T., 2008. Evidence for divergent selection between the molecular forms of *Anopheles gambiae*: role of predation. BMC Evolutionary Biology, 8(5).
- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kangne, P., Brengues, C., Baldet, T., Ouari, Simard, F. & Lehmann, T., 2006. Mixed swarms of the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in sympatric area from Burkina Faso. Journal of Medical Entomology, 43(3), pp.480-483.

- Diabaté, A., Dabire, R.K., Kim, E.H., Dalton, R., Millogo, N., Baldet, T., Simard, F., Gimnig, J.E., Hawley, W.A. & Lhemann, T., 2005. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), pp.548-553.
- Diabaté, A., Dao, A., Yaro, A.S., Adamou, A., Gonzalez, R., Manoukis, N.C., Traoré, S.F., Gwadz, R.W. & Lehmann, T., 2009. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1676), pp.4215-4222.
- DICK GW, e. (2017). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. - PubMed NCBI . Ncbi.nlm.nih.gov. Retrieved 26 October 2017, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952;46:509-520
- Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1953;47:13-48
- Donalisio MR, Freitas ARR. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2015;18(1):283–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2015000100283&lng=pt&tlng=pt
- Duffy MR, Chen T-HH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;360(24):2536–43. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa0805715>.
- Gershman, M.D., Staples, J.E., CHAPTER 8 Yellow fever. 2015; [Internet]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/aeaa/4f9c2bc74fe164902ad043853f5ec6f5c5d0.pdf>
- Gillies, M.T. & Coetzee, M., 1987. A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Publications of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 143pp.

- Gillies, M.T. & Coetzee, M., 1987. A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara (Afrotropical Region). Publications of the South African Institute for Medical Research, Johannesburg, 143pp.
- Gimonneau, G., Bouyer, J., Morand, S., Besansky, N.J., Diabate, A., Simard, F.A., behavioral mechanism underlying ecological divergence in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Behav Ecol.* 2010;21(5):1087–92.
- Ginmonneau, G., Pombi, M., Choisy, M., Morand, S., Dabiré R., & Simard F. (2011). Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Medical And Veterinary Entomology*, 26(1), 9-17. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00957.x.
- Gonçalves, A., Ferrinho, P., Dias, F. The Epidemiology of Malaria in Prábis, Guinea-Bissau. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(1):11–9.
- Gordicho, V., Vicente, J.L., Sousa, C.A, Caputo, B., Pombi, M., Dinis, J., et al. First report of an exophilic *Anopheles arabiensis* population in Bissau City, Guinea-Bissau: recent introduction or sampling bias? *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):423. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-423>.
- Governo da Guiné-Bissau - O País. (2017). Gov.gw. Retrieved 26 October 2017, from http://www.gov.gw/index.php?option=com_content&view=article&id.
- Gubler, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1998;4(3):442–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716967> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2640300>.
- Guzman, M.G. Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2017 Set 1;8:S7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- Gyawali, N., Bradbury, R.S., Taylor-Robinson, A.W. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infect Dis Poverty* [Internet].

- Infectious Diseases of Poverty; 2016;5(1):37. Available from: <http://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-016-0132-y>.
- Hasan, S., Jamdar, S.F., Ala-lowi, M., Al Ageel Al Beaiji SM (2016). Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent* 6, 1-6.
- Hoshi, T., Imanishi, N., Higa, Y., Chaves, L.F. Mosquito Biodiversity Patterns Around Urban Environments in South-Central Okinawa Island, Japan. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2014;30(4):260–7. Available from: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/14-6432R.1>
- Jaenson T.G.T., Gomes M.J., Santos R.C.B., Petrarca V., Fortini D., Evora J. & Crato J., 1994. Control of endophagic *Anopheles* mosquitoes and human malaria in Guinea Bissau, West Africa by permethrin-treated bed nets. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:620– 624.
- Jentes, E.S., Lash, R.R., Johansson, M.A., Sharp, T.M., Henry, R., Brady, O.J., et al. Evidence-based risk assessment and communication: a new global dengue-risk map for travellers and clinicians. *J Travel Med*. 2016;23(6):2016.
- Kamdem, C., Tene Fossog, B., Simard, F., Etouna, J., Ndo, C., Kengne, P., et al. Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS One*. 2012;7(6). e39453.
- Kasner E, Hunter CA, Ph D, Kariko K, Ph D. NIH Public Access. 2013;70(4):646–56.
- Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., ... Hay, SI (2015). A distribuição global dos vetores de arbovírus *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <http://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kudom A.A., Larval ecology of *Anopheles coluzzii* in Cape Coast, Ghana: water quality, nature of habitat and implication for larval control. *Malar J* [Internet]. 2015;14(1):447. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0989-4>
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 1998;72:73-83

- Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
- Lehmann, T. & Diabaté, A., The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infect Genet Evol.* 2008;8(5):737–46.
- Lopes, N., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2014;5(3):55–64. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Marsden C.D., Lee Y., Nieman C.C., Sanford M.R., Dinis J., Martins C., Rodrigues A., Cornel A.J. & Lanzaro G.C., 2011. Asymmetric introgression between the M and S forms of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, maintains divergence despite extensive hybridization. *Molecular Ecology*, 20:4983– 4994
- Morales, A.J.R., Gómez, W.E.V., Paredes, C.F. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14(3):177–9.
- Murray Christopher JL, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet.* 2015 Aug 26; doi: 10.1016/S0140-6736(15)61340-X. Advance online publication.
- Murray, N.E.A., Quam, M.B., Wilder-Smith, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013;5(1):299–309.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):359–61.
- Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico, São Paulo.* 2002;64(2):205–7. Disponível em: <http://www.feis.unesp.br/Home/DTADM/STDARH/EquipedeDesenvolvimento/documentos/dengue/dengue%20-%20bioecologia.pdf>

- Nunes J da S. Dengue: Etiologia, patogénese e suas implicações a nível global. [dissertação] Universidade de Beira Interior; Covilhã. 2011.
- Nwakanma D.C., Neafsey D.E., Jawara M., Adiamoh M., Lund E., Rodrigues A., Loua K.M., Konate L., Sy N., Dia I., Awolola T.S., Muskavitch M.A.T. & Conway D.J., 2013. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 193:1221-1231
- Okwa, O.O., 2012. Introduction and Biology of Malaria. In: *Malaria Parasites*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 1-37.
- Oliveira E., Salgueiro P., Palsson K., Vicente J.L., Arez A.P., Jaenson T.G., Caccone A. & Pinto J., 2008. High levels of hybridization between molecular forms of *Anopheles gambiae* from Guinea Bissau. *Journal of Medical Entomology*, 45:1057–1063.
- Palsson, K., Jaenson, T.G.T., Dias, F., Laugen, A.T., Björkman, A., 2004. Endophilic *Anopheles* mosquitoes in Guinea Bissau, West Africa, in relation to human housing conditions. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), pp.746-752.
- Palsson, K., Pinto, J., do Rosário, V. & Jaenson, T.G., 1998. The palpal ratio method compared with PCR to distinguish between *Anopheles gambiae* s.s. and *A.melas* from Guinea Bissau, West Africa. *Acta Tropica*, 70(1), pp.101-107.
- Payne, R.O., Griffin, P.M., McCarthy, J.S., Draper, S.J. *Plasmodium vivax* Controlled Human Malaria Infection – Progress and Prospects. *Trends Parasitol.* 2017;33(2):141–50.
- Petrarca V., Carrara G.C., di Deco M.A. & Petrangeli G., 1983. Il complesso *Anopheles gambiae* in Guinea Bissau. *Parassitologia*, 25:29-39.
- Pinto Junior, V.L., Luz, K., Parreira, R., Ferrinho, P. *Virus zika: Revisao para clinicos*. *Acta Med Port.* 2015;28(6):760–5.
- Prevention, C. (2017). Zika Virus in Cape Verde - Alert - Level 2, Practice Enhanced Precautions - Travel Health Notices | Travelers' Health | CDC. wwwnc.cdc.gov. Retrieved 26 October 2017, from <https://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/alert/zika-virus-cape-verde>.

- Ribeiro, H.& Ramos, C., H., Entomologia SP de. Guia ilustrado para a identificação dos mosquitos de Angola (Diptera: Culicidae) [Internet]. Sociedade Portuguesa de Entomologia; 1995. (Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia: Suplemento).
- Robin Y, Mouchet J Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1975;68:249–58
- Rodrigues A., Schellenberg J.A., Kofoed P-E., Aaby P. & Greenwood B., 2008. Changing pattern of malaria in Bissau, Guinea Bissau. Tropical Medicine and International Health, 13:410–417
- Saluzzo JF, Ivanoff B, Languillat G, Georges AJ Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon [in French] Bull Soc Pathol Exot Filiales 1982;75:262–6
- Sanchez L, Vanlerberghe V, Alfonso L, Marquetti MDC, Guzman MG, Bisset J, et al. Aedes aegypti larval indices and risk for dengue epidemics. Emerg Infect Dis. 2006;12(5):800–6.
- Santolamazza, F., Mancini, E., Simard, F., Qi, Y., Tu, Z. & della Torre, A., 2008. Insertion polymorphism of SINE200 retrotransposons within speciation islands of Anopheles gambiae molecular forms. Malaria Journal, 7:163.
- Service, M.W., 1993. Mosquitos (Culicidae). In: Medical insects and arachnids. Lane, R.P. & Crosskey, R.W. (Eds.). Chapman and Hall, London, pp.120-240.
- Silva HHG da, Silva IG da, dos Santos R.M.G, Rodrigues-Filho E, Elias CN. Larvicidal activity of tannins isolated of Magonia pubescens St. Hil. (Sapindaceae) against Aedes aegypti (Diptera, Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2004;37(5):396–9. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v37n5/21338.pdf>.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manquin, S., Coetzee, M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M., Van Boeckel, T., Godfray, H.C., Harbach, R.E & Hay, S.I., 2010. The dominants Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasites and Vectors, 3:117.

- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manquin, S., Rubio-Palis, Y., Coetzee, M., Chareonviriyaphap, T., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E & Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5:69.
- Stump, A.D., Fitzpatrick, M.C., Lobo, N.F., Traoré, S., Sagnon, N., Costantini, C., et al. Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(44):15930–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Taylor C, Touré YT, Carnahan J, Norris DE, Dolo G, Traoré SF, et al. Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa. *Genetics* [Internet]. 2001;157(2):743–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vainio, J., Cutts, F. Febre amarela. 1998; Escola de Higiene e Medicina Tropical de Londres. [Internet]. 2017. pp14. disponível na Internet em: <http://www.who.ch/gpv-documents/>
- Vicente, J.L, Clarkson, C.S., Caputo, B., Gomes, B., Pombi, M., Sousa, C.A, et al. Massive introgression drives species radiation at the range limit of *Anopheles gambiae*. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(March):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep46451>
- Weetman D, Wilding CS, Steen K, Pinto J, Donnelly MJ. Gene flow-dependent genomic divergence between *anopheles gambiae* M and S forms. *Mol Biol Evol*. 2012;29(1):279–91.
- White, B.J., Cheng, C., Simard, F., Costantini, C., Besansky, N.J., 2010. Genetic association of physically unlinked islands of genomic divergence in incipient species of *Anopheles gambiae*. *Molecular Ecology*, 19(5), pp.925-939.
- White, B.J., Lawniczak, M.K., Cheng, C., Coulibaly, M.B., Wilson, M.D., Sagnon, N., Costantini, C., Simard, F., Christophides, G.K. & Besansky, N.J., 2011. Adaptive divergence between incipient species of *Anopheles gambiae* increases resistance to *Plasmodium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), pp.244-249.

- White, G.B., 1985. *Anopheles bwambiae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An.gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 10(4), pp.501-522.
- WHO, 2003. *Malaria entomology and vector control. Part I. Learner's Guide*. World Health Organization, Geneva, 107pp.
- WHO, 2009. Regional Office for South-East Asia. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*. World Health Organization. Spec Program Res Train Trop Dis. pp147.
- WHO, 2009. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. World Health Organization, Fact Sheet No. 117. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- WHO, 2013. *Estrategia De Cooperacao Da OMS COM OS Paises 2009-2013: Guine-Bissau*. 2013.
- WHO, 2016 *World Malaria Report*. World Health Organization. 2016. 1-186 p. [Internet]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>
- WHO, 2016. *Dengue, Epidemiology*. World Health Organization. [Internet]. Available from: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>
- WHO, 2017. *Vector-borne diseases*. World Health Organization. [Internet]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>
- WHO, 2017. *World Malaria Report 2016*. World Health Organization, Geneva, 246pp.[Internet]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>
- Wirth, D.F., 2002. The parasite genome: biological revelations. *Nature*, 419, pp.495.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Países endêmicos da malária em 2000 e em 2016.

Figura 2. Evolução e dispersão global do DENV entre 1955 a 2007. Fonte: WHO (2009).

Figura 3. Alertas da dengue nos últimos três meses, outubro de 2017.

Figura 4. Alerta da Zika no ultimo mês, (outubro de 2017)

Figura 5. Países e territórios onde foram relatados casos de Chikungunya (abril de 2016).

Figura 6. Alertas da infecção por vírus da Febre Amarela no ultimo mês (outubro 2017).

Figura 7. Principais causas de morte em crianças menores de 5 anos, Guiné-Bissau, 2013.

Figura 8. Mapa das regiões de Biombo e Sector Autónomo de Bissau, com as 3 áreas de colheitas assinaladas.

Figura 9. Área Urbana com a delimitação das localidades abrangidas no estudo.

Figura 10. Área Semiurbana com a delimitação das localidades abrangidas no estudo.

Figura 11. Área Rural com a delimitação das localidades abrangidas no estudo.

Figura 12. Exemplo de capturas de mosquitos com recurso a armadilhas CDC.

Figura 13. Exemplo de uma armadilha ovitrap usada neste estudo.

Figura 14. Variação dos principais géneros de culicídeos por área de estudo.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Numero e frequência das espécies de mosquito capturados por área (urbana semiurbana e rural).

Tabela 2. Distribuição (em percentagem) dos indivíduos do complexo *An. gambiae s.l.* capturados, por área.

Tabela 3. Índices larvares para *Aedes aegypti*, por área de estudo.

Tabela 4. Tipo de criadouros prospectados nas áreas de estudo.

Tabela 5. Distribuição dos ovos de *Aedes aegypti* capturados e proporção interna/externa.

ANEXOS

Protocolo para extração de DNA genómico de mosquitos

NZY Tissue gDNA Isolation kit – Nzytech

Material

▣ ddH₂O estéril

▣ Pinças

▣ Tubos 1,5ml

▣ “pestles”

▣ Etanol (96-100%)

Início da Extração

1.1. Identificar dois tubos de centrífuga (1,5ml) por cada mosquito a extrair (incluir o controlo negativo).

1.2. Identificar uma coluna de extração (fornecida com o kit) por cada mosquito (incluir o controlo negativo).

1.3. Colocar banho-maria a 56°C.

Homogeneização

2.1. Colocar um mosquito por tubo de 1,5ml.

2.2. Adicionar **180 µl de Buffer NT1**.

2.3. Homogeneizar utilizando um “pestle” por cada amostra.

2.4. Adicionar **25 µl de proteinase K a cada amostra**.

2.5. Agitar no vortex e incubar a 56°C durante 1-3 horas.

Lise

3.1. Adicionar **200 µl de Buffer NL** à amostra, agitar cuidadosamente num vortex durante 10 segundos.

3.2. No caso de haver partículas insolúveis visíveis (restos quitinosos), centrifugar 5 minutos a 13500 rpm e transferir o sobrenadante para num **novo tubo de centrífuga 1.5 ml**.

3.3. Guardar o “pellet” do tubo de centrífuga antigo, e congelar a -20°C. Por precaução, guarda-se este tubo como “backup”, se a extração de DNA correr mal.

Adição de etanol

4.1. Adicionar **210 µl de etanol absoluto (96-100%)**, a todas as amostras.

4.2. Agitar imediatamente no vortex.

Adsorção do DNA

5.1. Transferir a mistura do passo 5 para uma coluna NZYSpin Tissue Column, previamente instalada num tubo de 2 ml (de origem). Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido e colocar a coluna NZYSpin num novo tubo de 2ml (de origem).

Lavagem da membrana

6.1. Adicionar **500 µl** de tampão **NW1** à coluna. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido e colocar a coluna NZYSpin no mesmo tubo.

6.2. Adicionar **600 µl** de tampão **NW2** (garantir que já adicionado etanol ao tampão) à coluna, e centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido.

Secar a membrana

7.1. Colocar a NZYSpin Tissue Column no mesmo tubo e centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos.

8. Eluição do DNA

8.1. Colocar a coluna num novo tubo de 1.5 ml e adicionar **100 µl** de Tampão NE, TE ou água Milli-Q estéril, diretamente na membrana da coluna.

8.2. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 12000 rpm durante 2

minutos para eluir o DNA.

8.3. Aliquotar e conservar a -20°C.

Materiais

ddH₂O estéril Pinças PBS

Tubos 1,5ml “pestles” Etanol (96-100%)

Início da Extração

Identificar dois tubos de centrífuga (1,5ml) por cada mosquito a extrair (incluir o controlo negativo).

Identificar uma coluna de extração (fornecida com o kit) por cada mosquito (incluir o controlo negativo).

Colocar banho-maria a 56°C.

Homogeneização

Colocar um mosquito por tubo de 1,5ml.

Adicionar **180 µl de Buffer NT1**.

Homogeneizar utilizando um “pestle” por cada amostra.

Adicionar **25 µl de proteinase K a cada amostra**.

Agitar no vortex e incubar a 56°C durante 1-3 horas.

Lise

Adicionar **200 µl de Buffer NL** à amostra, agitar cuidadosamente num vortex durante 10 segundos.

No caso de haver partículas insolúveis visíveis (restos quitinosos), centrifugar 5 minutos a 13500 rpm e transferir o sobrenadante para um **novo tubo de centrífuga 1.5 ml**.

Guardar o “pellet” do tubo de centrífuga antigo, e congelar a -20°C. Por precaução, guarda-se este tubo como “backup”, se a extração de DNA correr mal.

Adição de etanol

Adicionar **210 µl de etanol absoluto (96-100%)**, a todas as amostras.

Agitar imediatamente no vortex.

Adsorção do DNA

Transferir a mistura do passo 5 para uma coluna NZYSpin Tissue Column, previamente instalada num tubo de 2 ml (de origem). Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.

Descartar o líquido e colocar a coluna NZYSpin num novo tubo de 2ml (de origem).

Lavagem da membrana

Adicionar **500 µl** de tampão **NW1** à coluna. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.

Descartar o líquido e colocar a coluna NZYSpin no mesmo tubo.

Adicionar **600 µl** de tampão **NW2** (garantir que já adicionado etanol ao tampão) à coluna, e centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto. Descartar o líquido.

Secar a membrana

Colocar a NZYSpin Tissue Column no mesmo tubo e centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos.

Eluição do DNA

Colocar a coluna num novo tubo de 1.5 ml e adicionar **100 µl** de Tampão NE, TE ou água Milli-Q estéril, diretamente na membrana da coluna.

Incubar 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos para eluir o DNA.

Aliquotar e conservar a -20°C.